



No. 08-075690- -00010-0000

Fecha: 2013-02-15 17:20:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 127

Señor Superintendente
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMER
E. S. D.

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 412

Referencia : Expediente No. **08.075.690**
Asunto : Solicitud de patente para: **PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITO MEJORADA PARA TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS**
Solicitante : **BAXTER INTERNATIONAL INC., BAXTER HEALTHCARE S.A., NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD**
Fecha de solicitud : 22 de Julio de 2008.

I. RECURSO VÍA GUBERNATIVA

Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de las sociedades **BAXTER INTERNATIONAL INC., BAXTER HEALTHCARE S.A. y NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD** solicitantes de la patente de la referencia, por el presente escrito atentamente manifiesto a usted que debidamente notificada de la Resolución No. **81960** del 28 de Diciembre de 2012, interpongo en su contra el recurso de **REPOSICIÓN**, para que sea revocada y en consecuencia se conceda el privilegio de patente de invención para **“PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITO MEJORADA PARA TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS”** a favor de **BAXTER INTERNATIONAL INC., BAXTER HEALTHCARE S.A. y NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD**.

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

II. OPORTUNIDAD DE LA IMPUGNACIÓN

La Resolución No. **81960** del 28 de Diciembre de 2012, con fecha de publicación listado 8 de Enero de 2013, fecha de vencimiento 8 de Febrero de 2013, y fecha del término legal 15 de Febrero de 2013.

III. LA DECISIÓN RECURRIDA

3.1 Mediante la Resolución objeto de la presente impugnación, el Superintendente de Industria y Comercio decidió:

3.1.1 Denegar la patente de invención a la creación titulada: **“PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITO MEJORADA PARA TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS”**

3.2 En la parte motiva de la providencia, se mencionaron los siguientes fundamentos:

3.2.1 “El objeto de la invención se refiere a la necesidad de proporcionar un método para detectar contaminantes pirogénicos sin endotoxina en productos médicos, problema que se pretende solucionar mediante un método para detectar pirógenos que consiste en combinar la muestra con sangre completa (que contiene células mononucleares de sangre periférica) en tubos de polipropileno (primer sistema de ensayo) y detectar por ELISA el IL-6 sobre una alícuota del primer ensayo.” (énfasis añadido)

3.2.2 “Las características esenciales del anticuerpo [sic] de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual enseña un método para detectar pirógenos que consiste en combinar la muestra con sangre completa (que contiene células mononucleares de sangre periférica) en tubos de polipropileno (primer sistema de ensayo) y detectar por ELISA el IL-6 sobre una alícuota del primer ensayo (Pág. 589, Col. 2, Párr. 2).” (énfasis añadido)

- 3.2.3 "En consecuencia, la reivindicación 1 no es nueva, según lo divulgado en el documento D1."
- 3.2.4 "Dado que las reivindicaciones dependientes 2, 4 a 21 (en parte) y las reivindicaciones independientes 37 y 38 no presentan alguna característica adicional que haga nuevo al objeto de la reivindicación1, se considera que tampoco son nuevas."
- 3.2.5 "La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 3, y el método del documento D2 consiste en que las superficies tienen polipropileno."
- 3.2.6 "No hay evidencia en la solicitud estudiada, de que el incluir el polipropileno proporcione un método con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el método del documento D2."
- 3.2.7 "Por lo tanto, la persona normalmente versada en la materia, realizaría el método que se conoce en el documento D2 con las placas de fondo plano o fondo en U de polipropileno que se divulgan en el documento D3, logrando de esta manera el método alternativo reivindicado. Por lo cual la reivindicación 3 de la solicitud se considera obvia y, en consecuencia, no tiene nivel inventivo."
- 3.2.8 "El equipo de las reivindicaciones 22 a 36, que se caracteriza porque con él se realiza el método de las reivindicaciones precedentes, no tiene nivel inventivo, dado que aquel no lo tiene."
- 3.2.9 "Es oportuno aclarar que, contrario a lo afirmado por las solicitantes, el método de esta solicitud no tiene nivel inventivo y su argumento según el cual el depósito de microtitulación en que se realiza el método de esta solicitud tiene polipropileno y una forma "tal" que el reactivo que contiene monocitos se concentra y logra mayor contacto célula con célula que en el método del estado de la técnica, no es así, porque el depósito de microtitulación conocido, según los documentos recuperados, también puede ser de polipropileno y tiene forma de U. Se reitera que el método del documento D1 se lleva a cabo en placas de fondo plano o fondo

en U de estireno o de PVC recubiertas (resumen, Pág. 213, col 1, Parr. 2, Col. 2, Párr. 3) y el método del documento D3 se lleva a cabo en placas de fondo plano o fondo en U de polipropileno (Párrs. 1, 2.4.2 y 2.5.2.). De otro lado, las reivindicaciones de la solicitud estudiada no mencionan como característica técnica esencial la forma del depósito, ni hay evidencia de que esta haya sido la causa de algún efecto técnico sorprendente que pueda ser directamente atribuido a ella. Por esto, y considerando que no hay evidencia de que el método reivindicado proporcione algún efecto técnico que sea sorprendente para la persona versada en la materia, este se considera obvio y, en consecuencia, no tiene nivel inventivo.”

3.2.10 “Referente a la argumentación según la cual el documento EDTNA/ERCA Guidelines: Technical Section 1.1.6.3 (EDTNA/ERCA Journal 28(3): 107-115 (2002) desalienta a la persona versada a utilizar polipropileno porque este puede absorber endotoxina, se aclara que de manera posterior a dicha publicación, el documento D3 (en el año 2005) recomendó lo contrario: es decir, recomendó utilizar polipropileno en los microtituladores en los cuales se hacen los ensayos para detectar pirógenos, que es la misma solución que se propone ahora en la solicitud estudiada, por lo cual se considera que esta solicitud no tiene nivel inventivo.”

IV. OBJETO DEL RECURSO

De acuerdo con los argumentos que expongo a continuación, solicito atentamente a su Despacho lo siguiente:

1. Revocar la Resolución No. **81960** del 28 de Diciembre de 2012.
2. Conceder el privilegio de patente de invención para **“PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITO MEJORADA PARA TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS”** a favor de **BAXTER INTERNATIONAL INC., BAXTER HEALTHCARE S.A. y NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD.**

V. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

Respetuosamente me permito disentir de lo expuesto por ese Despacho en la Resolución objeto del presente recurso, toda vez que la presente solicitud sí cumple con los requerimientos de novedad y nivel inventivo exigidos en la Decisión 486, como se demostrará a continuación:

5.1 Modificación de una solicitud en trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 38 reivindicaciones, junto con un nuevo juego de figuras.

El nuevo pliego es esencialmente igual al anterior, pero se ha reemplazado el término “equipo” por “kit”, para utilizar la misma terminología que el “INSTRUCTIVO EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD” de su Despacho utiliza para este tipo de elementos.

Las nuevas figuras corresponden esencialmente con las originales, pero se diferencian de forma más clara los resultados obtenidos para el poliestireno y el polipropileno en las figuras 11A y 11B.

5.2 La presente solicitud sí tiene novedad

En primer lugar, se debe mencionar que el señor Examinador ha hecho una equivalencia errónea entre los elementos “depósito de microtitulación” y “tubo”.

El documento D1 enseña el uso de tubos de polipropileno esterilizados en la página 589. Sin embargo, una persona normalmente versada en la materia reconocerá evidentemente que dichos tubos de polipropileno no corresponden a depósitos de

microtitulación, ya que dichos tubos (tales como tubos de ensayo) no permiten, por sus características geométricas, realizar un proceso de microtitulación.

Así, el hecho de que el documento D1 enseñe un elemento cualquiera hecho de polipropileno (tubos esterilizados) no anticipa la característica “la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno” de la reivindicación 1, ya que ésta especifica que es el depósito de microtitulación, y no cualquier otro elemento aleatorio, el que se debe recubrir o construir con polipropileno.

El documento D1 sí enseña un depósito de titulación, ya que define una placa de 24 depósitos (pocillos) (página 589, columna 1) en los que se puede realizar la microtitulación, sin embargo, no existe en dicho documento ninguna mención a la forma ni al material de dichos depósitos.

En conexión con lo anterior, se desea mencionar que no se ha encontrado ninguna divulgación, enseñanza o sugerencia en D1 que se refiera a depósitos de microtitulación hechos o con recubrimiento de polipropileno con una forma que no sea plana.

Así, resulta evidente entonces que el documento D1 no anticipa la característica esencial de la reivindicación 1:

“al menos un depósito de microtitulación formado de manera que el reactivo que contiene monocitos se concentre para proporcionar un mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, en donde la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno”

Queremos llamar la atención del Despacho, que el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina se ha pronunciado en diversas oportunidades en relación a la forma de evaluar la novedad. En la interpretación 36-IP-2010 el Tribunal ha dicho que “*El Tribunal ha tomado como referencia criterios de las Cámaras de Recursos de la Oficina Europea de Patentes (OEP), mediante los cuales “la falta de novedad de una invención se*

configurará si su objeto deriva clara, precisa y directamente del estado de la técnica, y si en éste son conocidas todas las características de aquélla". En el presente caso se observa que el objeto reivindicado no se deriva clara, precisa y directamente del estado de la técnica dado que:

- Del estado de la técnica no puede desprenderse el uso, en la aplicación mencionada, de depósitos de microtitulación con fondo no plano.
- Del estado de la técnica no puede desprenderse uso, en la aplicación mencionada, de depósitos de microtitulación con recubrimiento o completamente hechos de polipropileno.

Dado que no es posible derivar clara, precisa y directamente de la anterioridad la presente invención con todas sus características técnicas, entonces la presente solicitud goza de novedad.

De acuerdo con los argumentos anteriormente explicados, la reivindicación independiente 1 es novedosa sobre el estado de la técnica. Como consecuencia de lo anterior, las reivindicaciones 2 a 38 son también novedosas ya que también incluyen dichas características novedosas.

5.3 La presente solicitud sí tiene nivel inventivo

En primer lugar, se desea aclarar que el documento D3 enseña (página 164 secciones 2.4.2 y 2.6.2) el uso de placas de 96 depósitos (pocillos) de cultivo de tejido BD Falcon de Beckton Dickson labware. Como se evidencia en el Anexo 8.3, dichas placas están hechas de poliestireno y tienen depósitos con fondos planos. El documento 3 también enseña (página 164, sección 2.4.3) el uso de placas Immuno 96 MicroWell F96 MaxiSorp de Life Technologies las cuales, como se evidencia en el Anexo 8.4, éstas placas están hechas de poliestireno y tienen depósitos con fondos planos (la letra "F" en la referencia indica el fondo plano, las placas con depósitos con fondo en forma de U corresponden a la referencia U96, la cual no es mencionada en D3). También se contempla en D3 (página 166, sección 2.9.2) el uso de las placas PF de 96 depósitos

(pocillos) de Dynex, sin embargo, éstas se especifican como placas de estireno y con fondo plano de los depósitos.

En vista de lo anterior, y después de una extensiva revisión del documento D3, no se ha encontrado en dicho documento ninguna divulgación de placas de polipropileno con fondo en U como lo afirma el señor Examinador, ya que todas las placas referenciadas están hechas de poliestireno y tienen fondo plano.

Con respecto al documento D2, el coautor Stephen Poole declara (ver anexo 8.5) que ninguno de los experimentos descritos en dicho documento incluyó el uso de placas de microtitulación con depósitos recubiertos, o completamente hechos, de polipropileno. La diferencia mencionada también es reconocida en la resolución arriba mencionada, que afirma: "La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 3, y el método del documento D2 consiste en que las superficies tienen polipropileno".

De acuerdo a lo anterior, no existe ninguna posible combinación de D2 y D3 que dé como resultado la presente invención, como está definida en cualquiera de las reivindicaciones independientes, con todas sus características técnicas esenciales. También cabe aclarar que D1 tampoco proporciona suficiente información para derivar las características de la presente invención que hacen falta en D2 y D3.

En específico, se puede notar que ninguno de los documentos D1, D2 o D3, ni ninguna posible combinación de ellos, anticipa la característica técnica esencial de la reivindicación 1:

"en donde la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno"

Con respecto a lo anterior, el señor Examinador enuncia: "No hay evidencia en la solicitud estudiada, de que el incluir el polipropileno proporcione un método con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el método del documento D2".

Respetuosamente disintimos de dicha afirmación, ya que la presente solicitud presenta, en las figuras 11A y 11B, una clara diferencia entre la respuesta IL-6 de las placas de poliestireno y las placas de polipropileno.

Las figuras anteriormente mencionadas han sido modificadas para que se pueda diferenciar más fácilmente entre dichas respuestas:

FIG. 11A

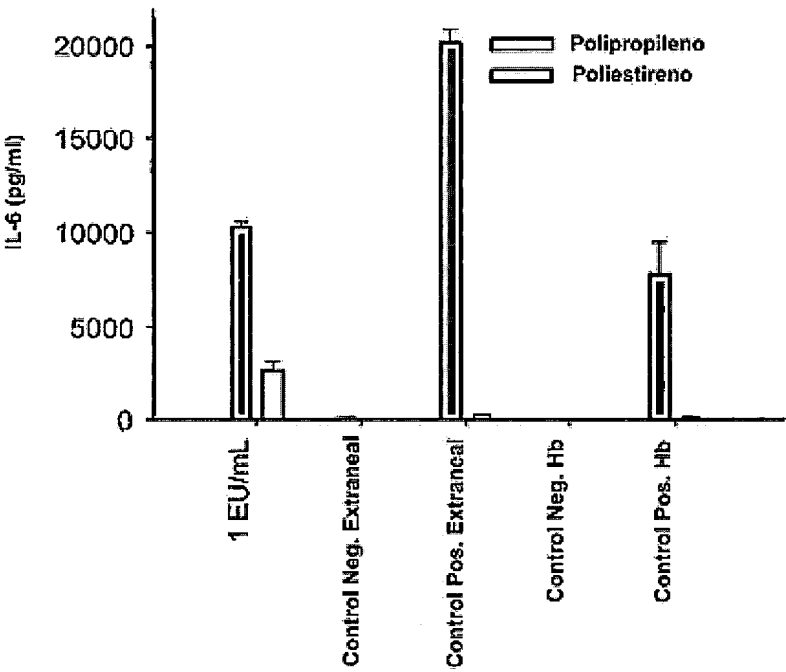
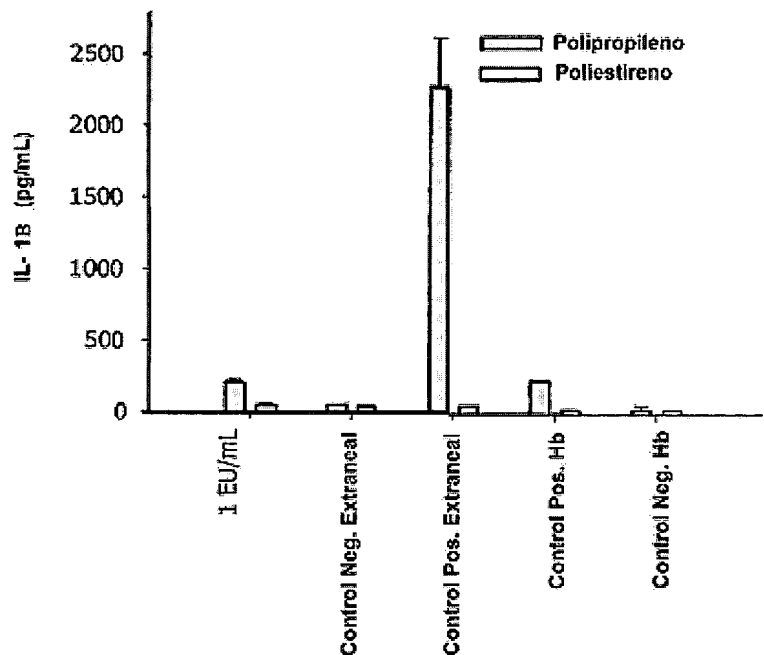


FIG. 11B



Así pues, se puede notar que la presente solicitud sí evidencia un efecto técnico ventajoso, sorprendente y completamente inesperado del uso de polipropileno en los depósitos de microtitulación.

Adicionalmente, el párrafo 5 de la declaración anexa de Stephen Poole (coautor de D2 y de la presente invención) menciona que el uso de depósitos de microtitulación de polipropileno con fondo no plano mostró una mejora significativa con respecto a la detección indirecta de pirógenos sin endotoxina. Dicha mejora está evidenciada en, por ejemplo, la gran diferencia entre la detección de IL-6 unido al anticuerpo específico de IL-6 (representado por la absorbancia a 450 nm) de los controles positivo y negativo extraneal cuando se usaron los depósitos de microtitulación no planos de polipropileno en el ensayo (Figura 12A de la presente solicitud), comparada a la diferencia entre dichos valores para ambos controles cuando se usaron depósitos de microtitulación de poliestireno con fondo plano en el ensayo (Figura 12B de la presente solicitud).

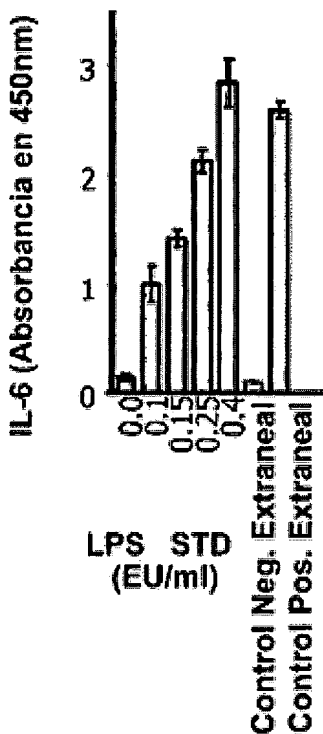


Figura 12A de la presente solicitud

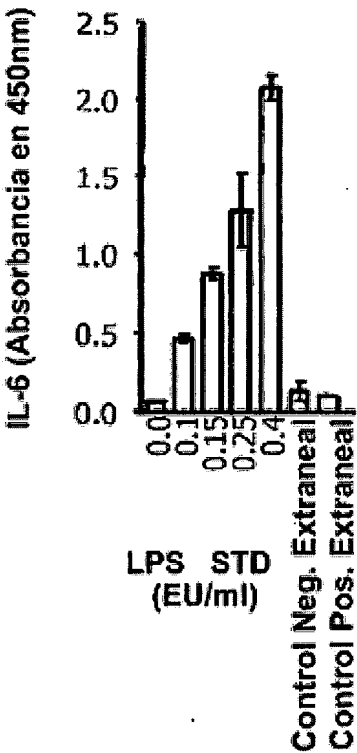


Figura 12B de la presente solicitud

Los resultados obtenidos para el uso de polipropileno en los depósitos de microtitulación con fondo no plano, ya que ni la forma ni el recubrimiento de éstos en el ensayo mostraron ninguna diferencia en cuanto a la detección de pirógenos en los estudios realizados en D2. La declaración de Stephen Poole enfatiza lo anterior en el párrafo 4. Dicho resultado, que se aleja de la materia reivindicada en la presente invención, se reporta en la página 213 de D2 en el primer párrafo de la sección de resultados.

En conclusión, debido a que los documentos D1, D2 y D3 no anticipan, por sí solos ni en combinación, el uso de depósitos de microtitulación con un fondo no plano y recubiertos o completamente hechos de polipropileno, y a que dicha característica novedosa tiene un efecto técnico ventajoso, sorprendente e inesperado, se considera que la reivindicación 1 es inventiva con respecto al estado de la técnica citado.

La reivindicación 2 también incluye la característica técnica novedosa e inventiva mencionada, por lo que también es inventiva sobre el estado de la técnica.

Las reivindicaciones 3 a 21 son también inventivas en virtud de su dependencia de la reivindicación 1, de la reivindicación 2 o de ambas.

Las reivindicaciones 22 a 36 se refieren a un kit utilizado para llevar a cabo el método de las reivindicaciones anteriores, el cual es novedoso e inventivo. Por lo tanto, dichas reivindicaciones también gozan de novedad y nivel inventivo.

Con respecto a las reivindicaciones 37 y 38, resulta pertinente mencionar que los requisitos de patentabilidad de éstas no fueron afectados ni mencionados en la resolución 81960, por lo que se considera que cumplen a cabalidad con los requisitos expresados en la Decisión 486 de la Comunidad Andina, y por consiguiente, se les debe otorgar el derecho de patente.

Adicionalmente, las reivindicaciones 37 y 38 mencionan específicamente *“un depósito de microtitulación formado de manera que el reactivo que contiene monocitos se concentre para proporcionar un mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, en donde la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno”*, característica que les confiere novedad y nivel inventivo.

Conclusión

Los documentos D1, D2 y D3 no resultan anterioridad válida capaz de afectar la novedad y el nivel inventivo del método de la presente solicitud.

Por todo lo anterior, consideramos que la presente solicitud cumple a cabalidad con los requerimientos de patentabilidad exigidos por la legislación actual, por lo que atentamente solicitamos en consideración lo siguiente:

VI. PETICIÓN

Por todo lo anterior, solicito a ese Despacho lo siguiente:

6.1 Que al considerar las razones precedentes se revoque la decisión contenida en la Resolución No. **81960** del 28 de Diciembre de 2012, en cuanto resuelve negar el privilegio de patente de invención.

6.2 Que se otorgue el privilegio de patente de invención para: que sea revocada y en consecuencia se conceda el privilegio de patente de invención para **“PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE MONOCITO MEJORADA PARA TENER MEJOR CAPACIDAD PARA DETECTAR CONTAMINANTES PIROGÉNICOS SIN ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS”** a favor de **BAXTER INTERNATIONAL INC., BAXTER HEALTHCARE S.A. y NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD.**

VII. NOMBRE Y DIRECCIÓN

El nombre y la dirección de los solicitantes recurrentes son los siguientes:

BAXTER INTERNATIONAL INC.

One Baxter Parkway,
Deerfield
Illinois 60015,
Estados Unidos de América

BAXTER HEALTHCARE S.A.

Hertistrasse 2,
Wallisellen, Kanton,
8304 Zurich,
Suiza

NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD.

Blanche Lane,

South Mimms,
Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG,
Reino Unido

VIII. ANEXOS

- 8.1 Nuevo pliego reivindicatorio con 38 reivindicaciones
- 8.2 Nuevo juego de figuras, con figuras de la 1 a la 15
- 8.3 Catálogo: placas de 96 depósitos (pocillos) de cultivo de tejido BD Falcon de Beckton Dickson Labware y traducción
- 8.4 Catálogo: placas Immuno 96 MicroWell F96 MaxiSorp de Life Technologies y traducción
- 8.5 Declaración de Stephen Poole y traducción
- 8.6 Guía EDTNA/ERCA: Sección técnica y traducción
- 8.7 Boletín ENDOSAFE y traducción
- 8.8 Copia del recibo mediante el cual se canceló la tasa de modificaciones.
- 8.9 Formulario de modificación de una solicitud en trámite

IX. NOTIFICACIONES

Atentamente manifiesto a usted que recibiré notificaciones en la Secretaria de su Despacho o en mi oficina de abogada situada en la Carrera 4ª. No. 72-35, piso 4º, de esta ciudad de Bogotá, D.C.

Señor Superintendente,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén
T.P.A. No. 23.555

COLO-16577-0841-001-0
SML\SML\ID-236089\WPC16577
No. M-2013-236089\SML

	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material

☒ Modificación a una Solicitud en trámite

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural

☐

Persona Jurídica

☒

BAXTER INTERNATIONAL INC.,

BAXTER HEALTHCARE S. A.

Y

NATIONAL BIOLOGICAL STANDARDS BOARD

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América,	One Baxter Parkway, Illinois 60015,	Deerfield,
Suiza	Y	8304 Zurich
Y	Hertistrasse 2, Wallisellen, Kanton,	Y
Reino Unido	Y	South Mimms,
Respectivamente	Blanche Lane, Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG,	Respectivamente
	Respectivamente	
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre De Páez Luz Clemencia	Documento de identificación C.C. 35.456.344	Tarjeta profesional T.P.A. 23.555
---	--	--------------------------------------

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 08.075.690

Aparece

Debe ser

Modificación:

☒ Modificación al capítulo reivindicatorio.

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 38 reivindicaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas. Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

☐ Modificación al capítulo descriptivo.

☐ Modificación al resumen.

☒ Modificación a los dibujos.

Presento nuevo juego de quince (15) figuras.

☐ Modificación al solicitante.

5. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación por \$125.000
- ☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	<i>Luz Clemencia Sobrera</i>
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

SML\NCA\WPC16577\ID-236192

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar pirógenos sin endotoxina en una muestra, en donde el método comprende los pasos de:

combinar un reactivo que contiene monocitos y la muestra que será probada en un primer sistema de ensayo que comprende al menos un depósito de microtitulación formado de manera que el reactivo que contiene monocitos se concentre para proporcionar un mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, en donde la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno;

incubar el reactivo que contiene monocitos y la muestra, en donde, cuando la muestra comprende un pirógeno, el reactivo que contiene monocito produce una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria;

transferir los contenidos de primer sistema de ensayo a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria; y

ensayar el segundo sistema de ensayo con respecto a la presencia de citocina o un transmisor endógeno enlazado al anticuerpo en la superficie;

mediante lo cual el nivel elevado de citocina o transmisor endógeno enlazado a la superficie indica la presencia de pirógenos en la muestra probada.

2. Un método para detectar pirógenos sin endotoxina en una muestra, en donde el método comprende los pasos de:

combinar un reactivo que contiene monocitos y la muestra que será probada en un sistema de ensayo que comprende

(i) al menos un depósito de microtitulación formado de manera que el reactivo que contiene monocitos se concentre para proporcionar un mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, en donde la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno, y

(ii) al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria;

incubar el reactivo que contiene monocitos y la muestra, en donde, cuando la muestra comprende un pirógeno, el reactivo que contiene monocitos produce una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria;

ensayar el sistema de ensayo para la presencia de citocinas o un transmisor endógeno enlazado al anticuerpo en la superficie;

mediante lo cual el nivel elevado de citocina o transmisor endógeno enlazado a la superficie indica la presencia de pirógenos en la muestra probada.

3. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la citocina se selecciona del grupo que consiste de interleucina-1 (IL-1), interleucina-1ra(IL-1ra), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), y un factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).

4. El método tal como se describe en la reivindicación 3, caracterizado porque la citocina es IL-6.

5. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el transmisor endógeno es endotelina.

6. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la muestra es un producto médico administrado en forma parenteral.

7. El método tal como se describe en la reivindicación 6, caracterizado porque el producto médico es un producto de sangre, solución de diálisis, vacuna y expansor de plasma.

8. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el primer sistema de ensayo o el sistema de ensayo comprende una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de depósitos de microtitulación, cada uno de los cuales tiene una forma de modo que el reactivo que contiene el monocito sea concentrado para proporcionar mayor contacto célula con célula en comparación a un depósito de microtitulación de fondo plano, en donde cada depósito de microtitulación comprende una superficie del depósito que comprende un revestimiento de polipropileno o cada depósito de microtitulación se compone enteramente de polipropileno.

9. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el depósito de microtitulación comprende una región superior abierta, una región superior que se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta, y una pared del fondo que se ahusa en diámetro desde la parte de arriba del punto más bajo hasta el punto más bajo.
10. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el depósito de microtitulación comprende una región superior abierta, una región que se extiende hacia abajo desde la región superior que tiene un extremo superior y un extremo de fondo, y una región inferior que tiene un extremo superior y un punto más bajo, extendiéndose la región inferior desde el extremo inferior de la región superior y ahusándose en diámetro más rápidamente que la región superior del extremo superior de la región inferior hacia el punto más bajo.
11. El método tal como se describe en la reivindicación 9, caracterizado porque la pared inferior de dicho depósito de microtitulación no es plano, curvado, parabólico o se extiende hacia abajo, o los lados de dicho depósito de microtitulación están inclinados hacia el interior.
12. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el sistema(s) de ensayo es un ensayo inmunoabsorbente enlazado por enzimas (ELISA) colorimétrico, un inmunoensayo radioetiquetado o un inmunoensayo etiquetado con fluorescencia.
13. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos comprende células mononucleares de sangre periférica o células de línea celular monolítica.
14. El método tal como se describe en la reivindicación 13, caracterizado porque la línea celular monolítica comprende una línea celular monolítica humana.
15. El método tal como se describe en la reivindicación 14, caracterizado porque la línea celular monocítica es MONOMAC-6, THP-1 o 28SC.
16. El método tal como se describe en la reivindicación 13, caracterizado porque la línea celular monocítica comprende una línea celular que tiene receptores tipo CD14 y Toll endógenos o que han sido transfectados con receptores tipo CD14 y/o Toll y/o genes reporteros para transmisores inflamatorios o pirogénicos.

17. El método tal como se describe en la reivindicación 13, caracterizado porque las células mononucleares de sangre periférica comprenden células mononucleares de sangre periférica humana.

18. El método tal como se describe en la reivindicación 13, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos se encuentra en dicho sistema de ensayo en una densidad celular que es mayor a la densidad celular de los monocitos en la sangre completa.

19. El método tal como se describe la reivindicación 13, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos está presente en dicho sistema de ensayo en una densidad celular de (i) al menos o aproximadamente 250,000, (ii) al menos o aproximadamente 500,000, (iii) al menos o aproximadamente 600,000, (iv) al menos o aproximadamente 700,000, (v) al menos o aproximadamente 800,000, (vi) al menos o aproximadamente 900,000, (vii) al menos o aproximadamente 1,000,000, (viii) al menos o aproximadamente 1,100,000, (ix) al menos o aproximadamente 1,200,000, (x) al menos o aproximadamente 1,300,000, (xi) al menos o aproximadamente 1,400,000, (xii) al menos o aproximadamente 1,500,000, (xiii) al menos o aproximadamente 1,600,000, (xiv) al menos o aproximadamente 1,700,000, (xv) al menos o aproximadamente 1,800,000, (xvi) al menos o aproximadamente 1,900,000 ó (xvii) al menos o aproximadamente 2,000,000 células por depósito, en el que la densidad celular no excede un máximo de densidad celular a la que nutrientes celulares insuficientes existen en el volumen de reactivo dentro del depósito para poder mantener las células en el depósito.

20. El método tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos comprende la sangre completa.

21. El método tal como se describe en la reivindicación 20, caracterizado porque la sangre completa comprende la sangre completa humana.

22. Un kit de diagnóstico que comprende:

- a) un primer sistema de ensayo que incluye al menos un depósito de microtitulación formado de manera que el reactivo que contiene monocitos se concentre para proporcionar un mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, en donde la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno;

b) un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria; y

c) instrucciones para incubar en el primer sistema de ensayo un reactivo que contiene monocitos y una muestra que será probada, transfiriendo los contenidos del primer sistema de ensayo a un segundo sistema de ensayo, y ensayando el segundo sistema de ensayo con respecto a la presencia de citocina o un transmisor endógeno enlazado al anticuerpo en la superficie.

23. Un kit de diagnóstico que comprende:

a) un sistema de ensayo que comprende (i) al menos un depósito de microtitulación formado de manera que el reactivo que contiene monocitos se concentre para proporcionar un mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, en donde la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno, y (ii) al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria; y

b) instrucciones para combinar el reactivo que contiene monocitos y una muestra que será probada en un sistema de ensayos, incubando el reactivo que contiene los monocitos y la muestra, y ensayando el segundo sistema de ensayo con respecto a la presencia de citocina o un transmisor endógeno enlazado al anticuerpo en la superficie.

24. El kit tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 22 o 23, que comprende un reactivo que contiene monocitos criopreservados.

25. El kit tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 22 a 24, caracterizado porque cada depósito de microtitulación del primer sistema de ensayo o el sistema de ensayo comprende monocitos criopreservados.

26. El kit tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 22 a 25, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos criopreservados se proporciona a un usuario final mediante el envío en hielo seco.

27. El kit tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 22 a 26, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos criopreservado se proporciona a un usuario final en alícuotas en el número óptimo de número de células por depósito.

28. El kit tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 22 a 27, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos criopreservado comprende células mononucleares de sangre periférica o células de línea celular monolítica criopreservada,

29. El kit tal como se describe en la reivindicación 28, caracterizado porque la línea celular monolítica comprende una línea celular monolítica humana seleccionada del grupo que consiste de: MONOMAC-6, THP-1 o 28SC, y una línea celular que tiene receptores tipo CD14 y Toll endógenos o que han sido transfectados con receptores tipo CD14 y/o Toll y/o genes reporteros para transmisores inflamatorios o pirogénicos.

30. El kit tal como se describe en la reivindicación 24, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos criopreservado comprende la sangre completa.

31. El kit tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 22 a 30, caracterizado porque la pared superior de dicho depósito de microtitulación no es plana, curva, parabólica o se extiende hacia abajo, o los lados de dicho depósito de microtitulación están inclinados hacia el interior.

32. El kit tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 22 a 30, caracterizado porque el depósito de microtitulación comprende una región superior abierta, una región superior que se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta, y una pared del fondo que se ahusa en diámetro desde la parte de arriba del punto más bajo hasta el punto más bajo.

33. El kit tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 22 a 30, caracterizado porque el depósito de microtitulación comprende una región superior abierta, una región que se extiende hacia abajo desde la región superior que tiene un extremo superior y un extremo de fondo, y una región inferior que tiene un extremo superior y un punto más bajo, extendiéndose la región inferior desde el extremo inferior de la región superior y ahusándose en diámetro más rápidamente que la región superior del extremo superior de la región inferior hacia el punto más bajo.

34. El kit tal como se describe en cualesquiera de las reivindicaciones 22 a 33, caracterizado porque la citocina o transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria se selecciona del grupo que consiste de interleucina-1 (IL-1), interleucina-1ra(IL-1ra),

interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral - α (TNF- α), y endotelina.

35. Un kit de diagnóstico que comprende:

- (i) una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de depósitos de microtitulación formados de modo que las células contenidas en cada depósito sean concentradas en comparación a un depósito de microtitulación de fondo plano, una superficie de dicho depósito que comprende polipropileno; y
- (ii) un reactivo que contiene monocitos criopreservados el cual está contenido en los depósitos de dicha placa, en donde el reactivo que contiene monocitos comprende células mononucleares de sangre periférica criopreservadas o células de línea celular monocítica criopreservada, está en contacto con las superficies de dichos depósitos.

36. Un kit de diagnóstico que comprende:

- (i) un sistema de ensayo para detectar pirógenos sin endotoxina en un producto médico administrado en forma parenteral, dicho sistema de ensayo comprende una placa de microtitulación que comprende una pluralidad de depósitos de microtitulación formados de modo que las células contenidas en cada depósito sean concentradas en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, una superficie de dicha pared comprendiendo polipropileno;
- (ii) un reactivo que contiene monocitos criopreservados que está contenido en los depósitos de la placa, en donde el reactivo que contiene monocitos comprende sangre completa criopreservada y está en contacto con la superficie de dichos depósitos; y
- (iii) un anticuerpo para IL-6.

37. Un método de análisis de una muestra, que comprende los pasos de:

combinar un reactivo que contiene monocitos y la muestra que será probada en un primer sistema de ensayo que incluye al menos un depósito de microtitulación formado de manera que el reactivo que contiene monocitos se concentre para proporcionar un mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, en donde la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno;

incubar el reactivo que contiene monocitos y la muestra;

transferir los contenidos del primer sistema de ensayo a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria; y

ensayar el segundo sistema de ensayo con respecto a la presencia de citocina o un transmisor endógeno enlazado al anticuerpo en la superficie, mediante la cual la muestra es probada.

38. Un método de análisis de una muestra, que comprende los pasos de:

combinar un reactivo que contiene monocitos y la muestra que será probada en un primer sistema de ensayo que comprende

(i) al menos un depósito de microtitulación formado de manera que el reactivo que contiene monocitos se concentre para proporcionar un mayor contacto célula con célula en comparación con un depósito de microtitulación de fondo plano, en donde la superficie del depósito de microtitulación comprende un revestimiento de polipropileno o la totalidad del depósito de microtitulación se compone de polipropileno, y

(ii) al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citocina o un transmisor endógeno de la respuesta inflamatoria;

incubar el reactivo que contiene monocitos y la muestra; y

ensayar el sistema de ensayo para la presencia de citocinas o un transmisor endógeno enlazado al anticuerpo en la superficie, mediante la cual la muestra es probada.

FIGURAS

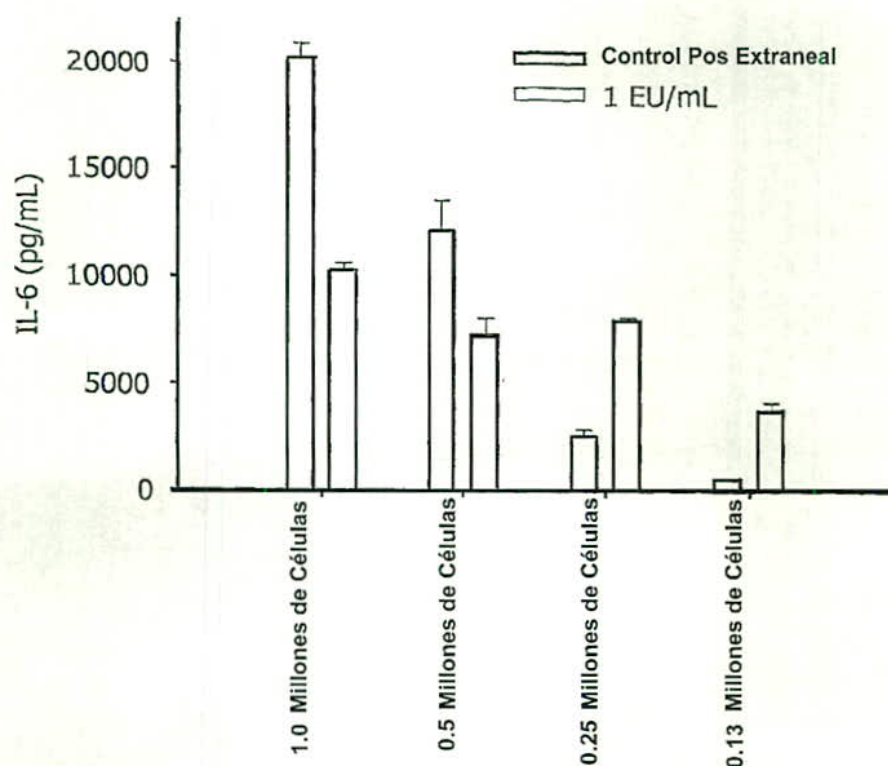


FIG. 1

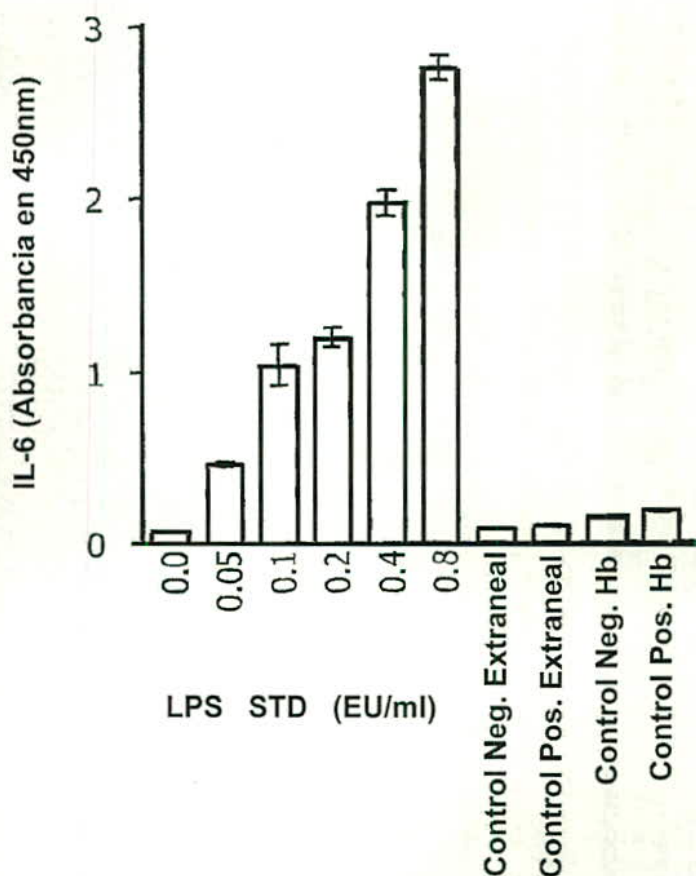


FIG. 2

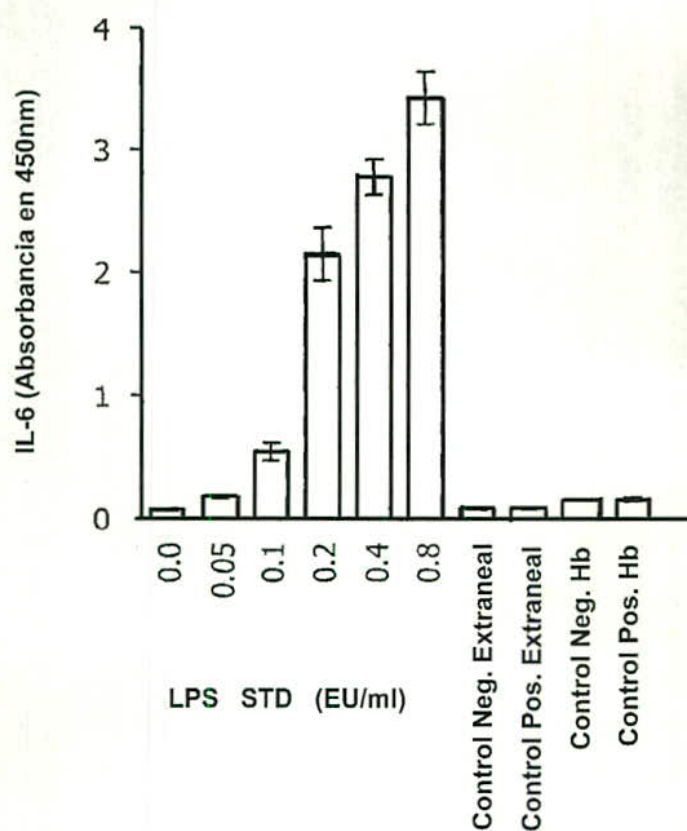


FIG. 3

FIG. 4

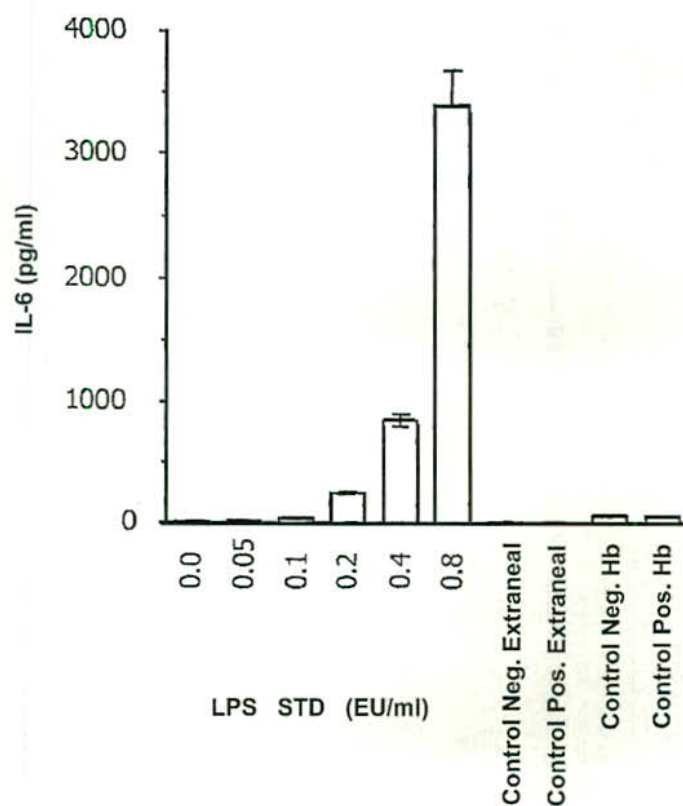


FIG. 5

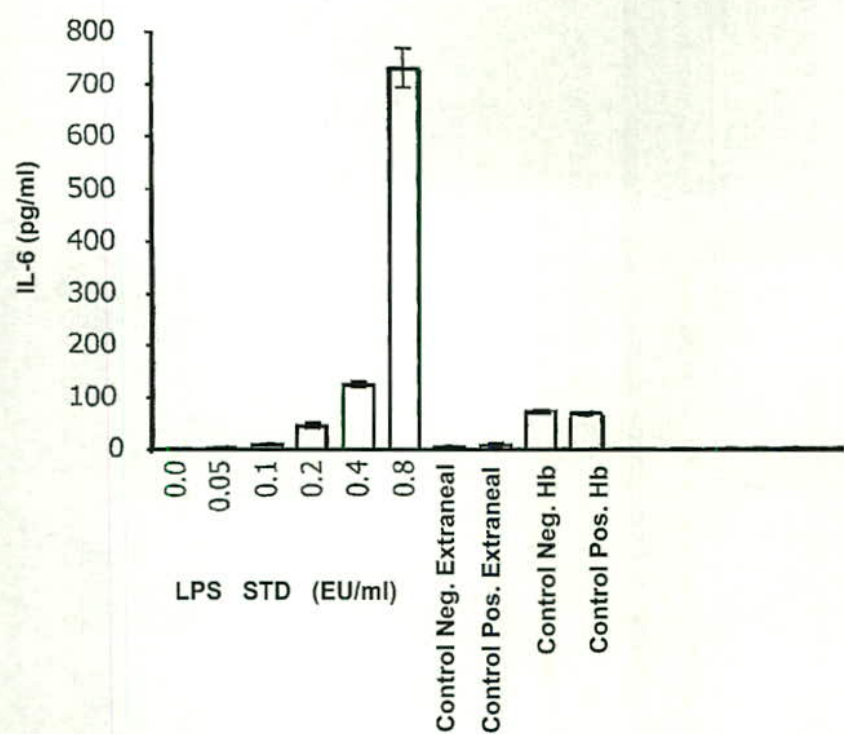


FIG. 6

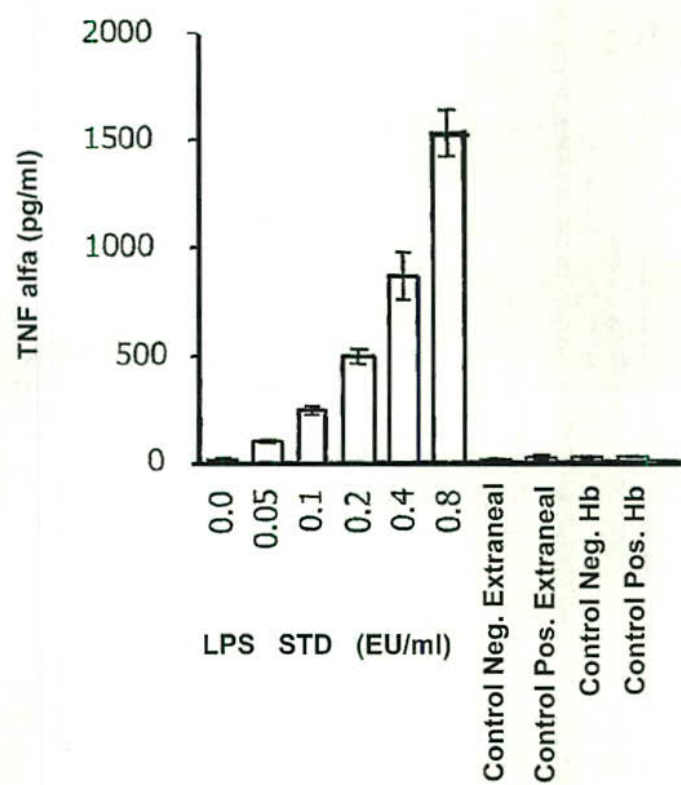


FIG. 7

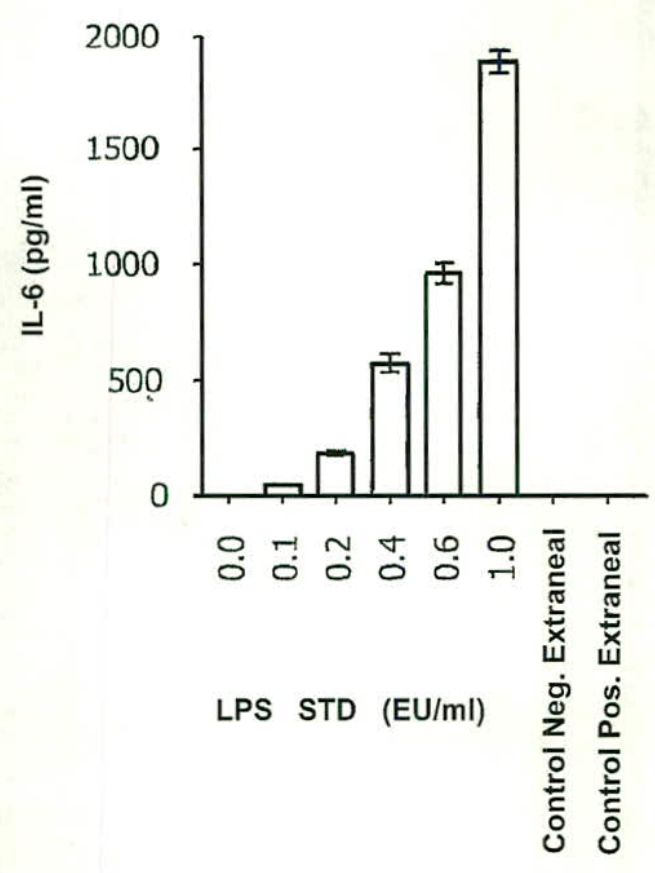
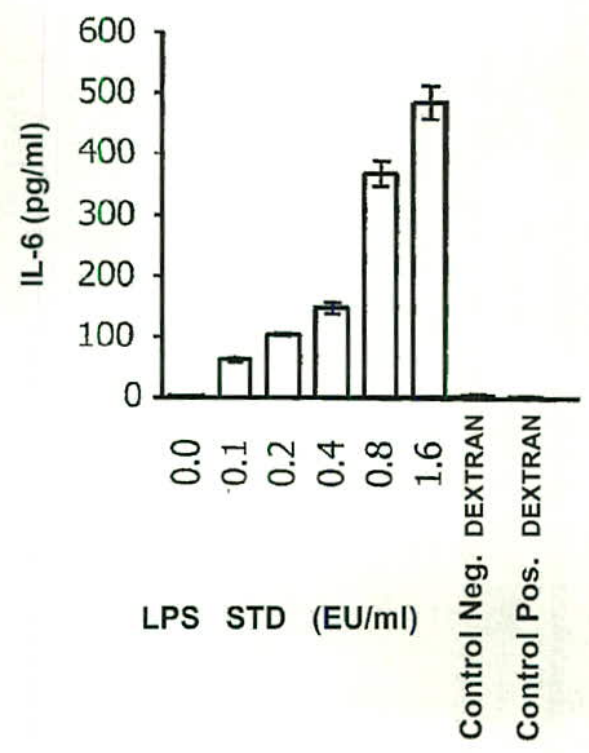


FIG. 8



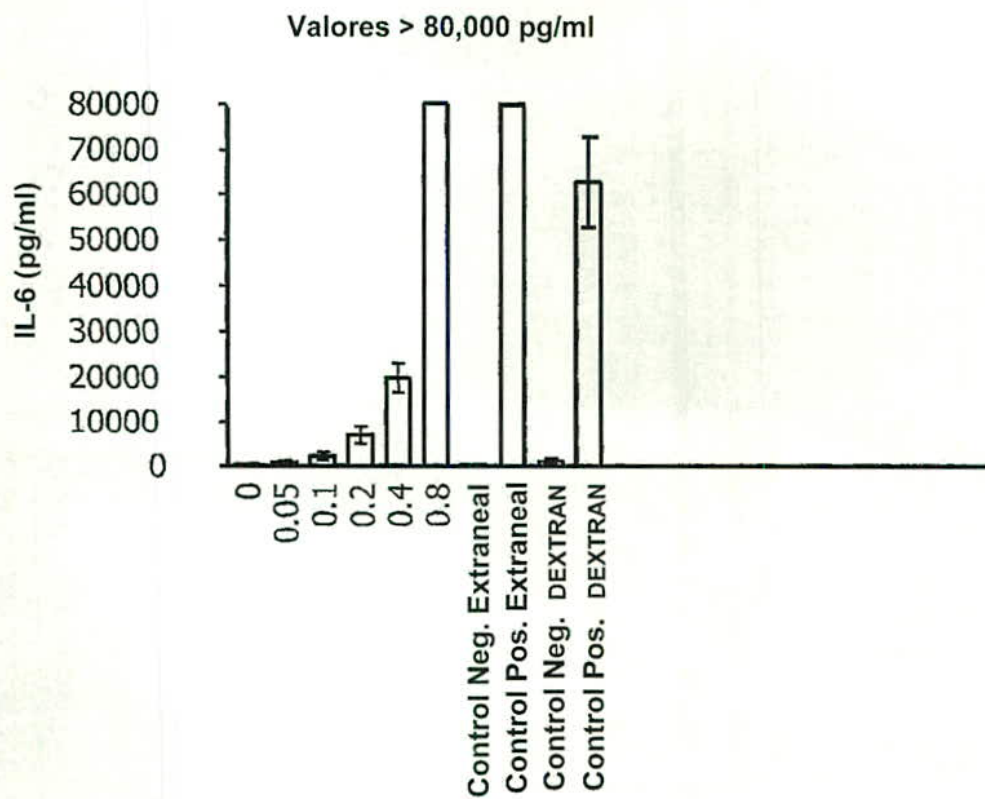


FIG. 9

FIG. 10

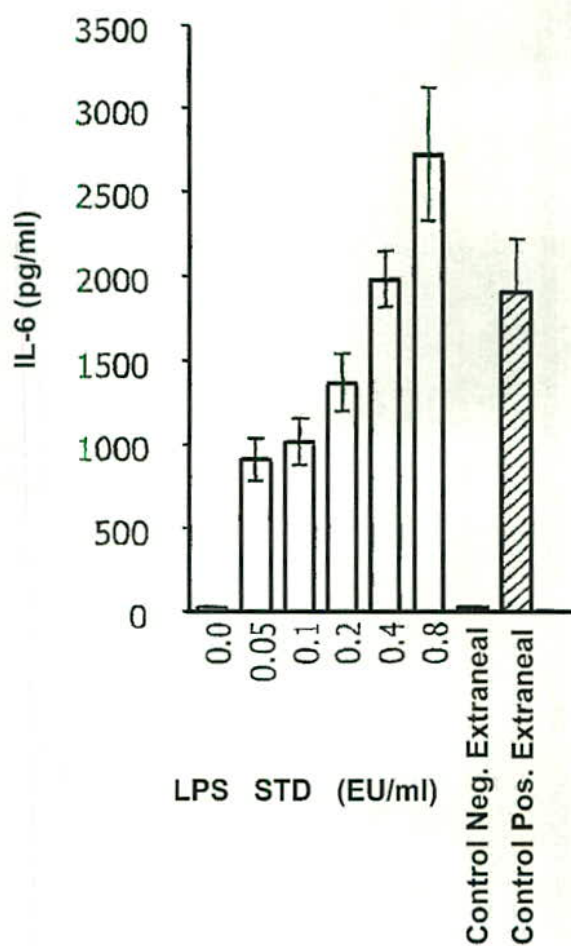


FIG. 11A

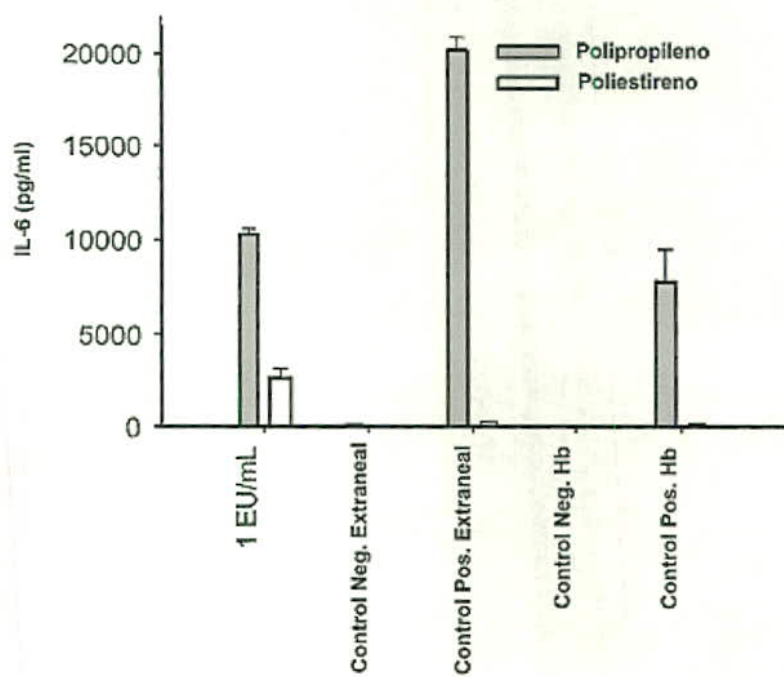


FIG. 11B

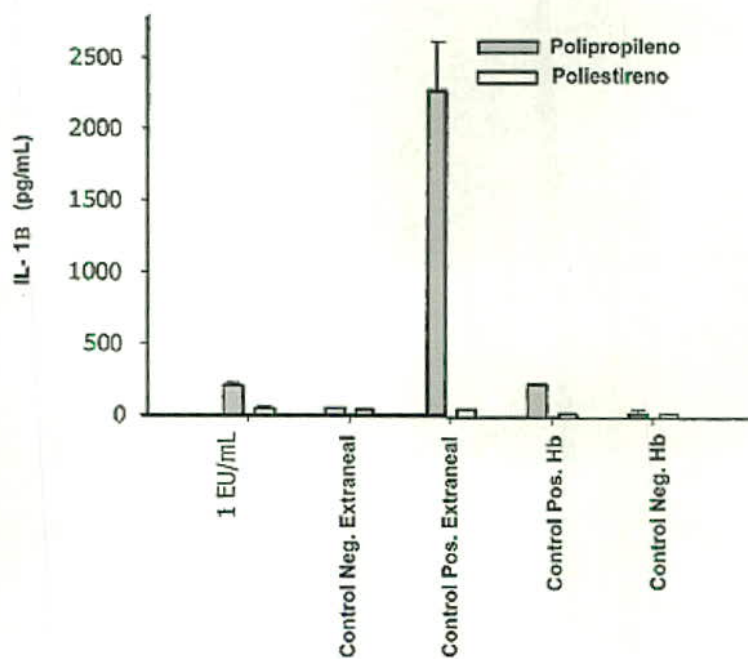


FIG. 12A

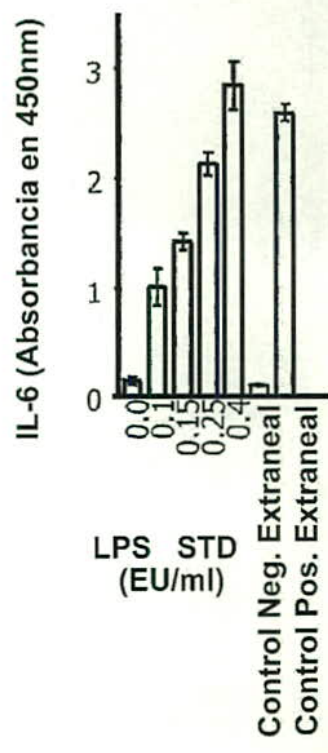


FIG. 12B

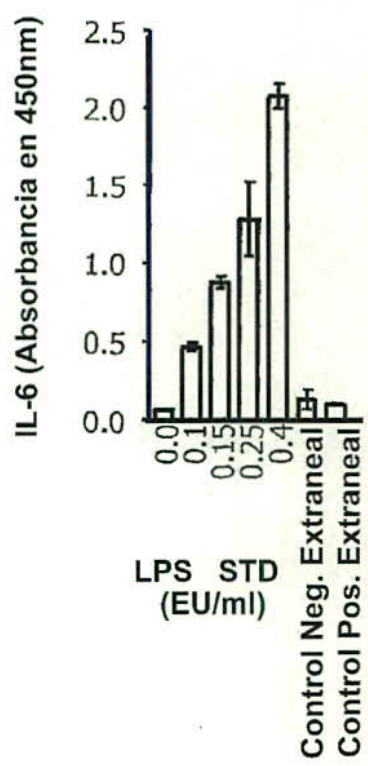


FIG. 13A

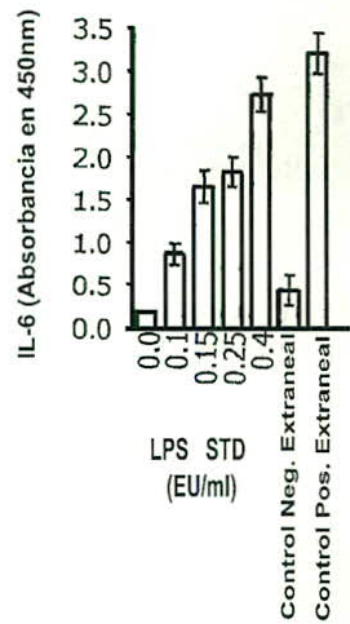


FIG. 13B

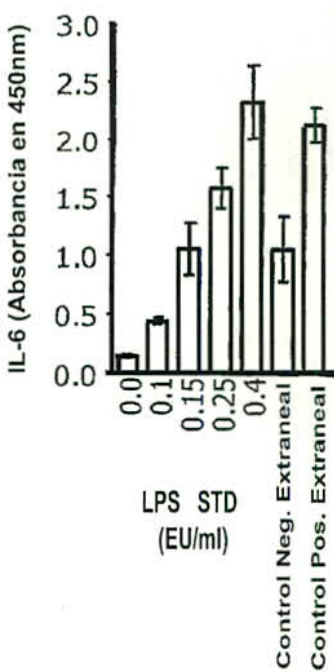


FIG. 14A

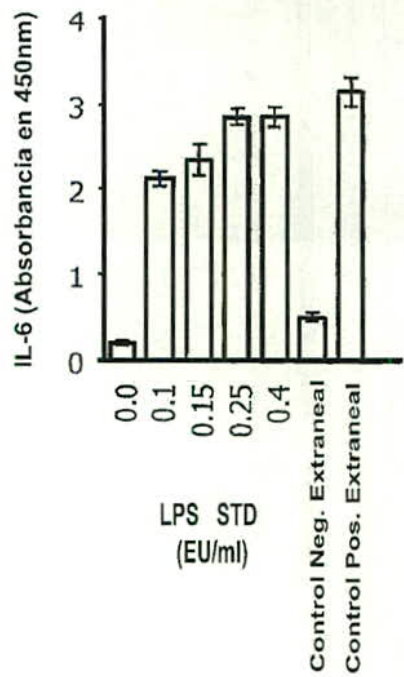


FIG. 14B

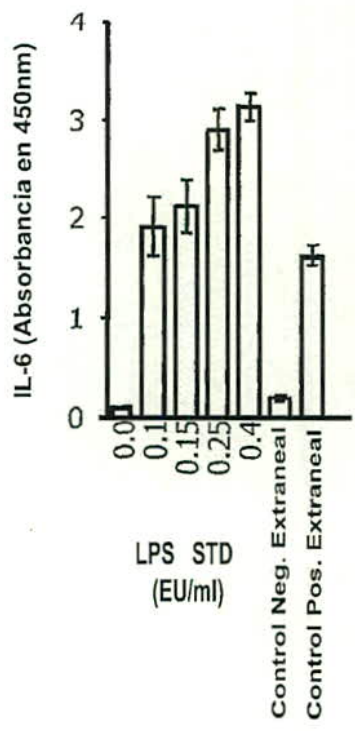
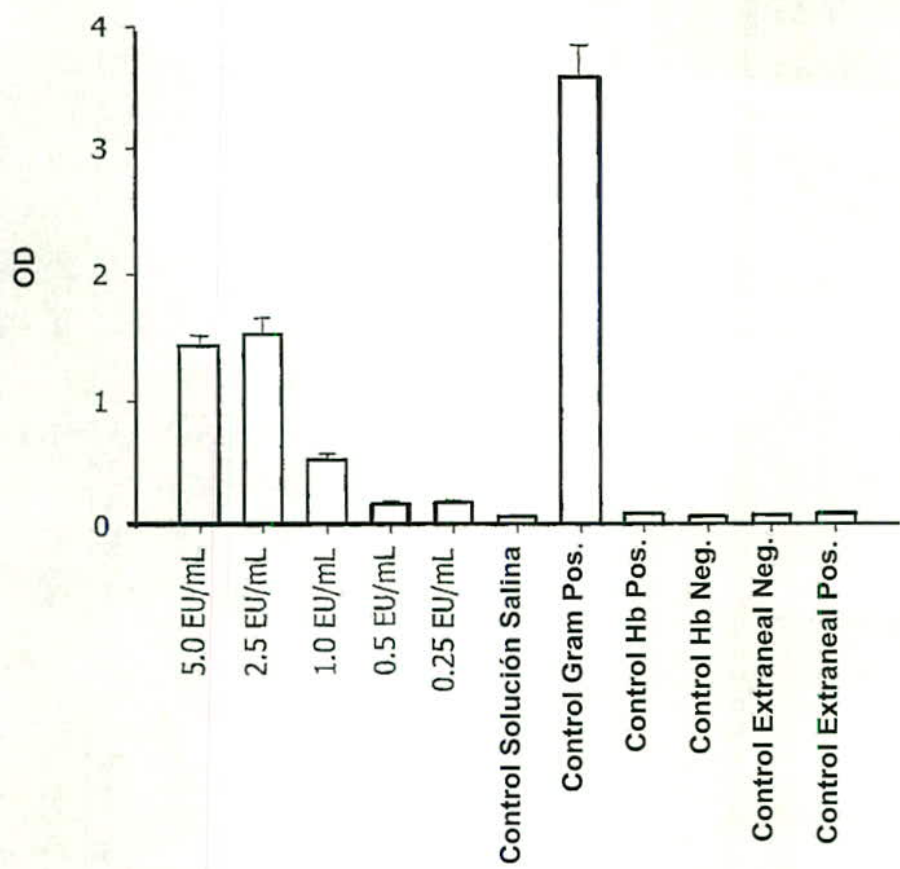


FIG. 15



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 13 - 0014271	
				Bogotá D.C., Febrero 13 de 2013 - 10:45:43	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	197827836	13/02/2013	34.841.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	SOLICITUD MODIFICACIONES CAMBIO SOLICITANTE POR CESION	125.000.00	125.000.00	
				\$125.000.00	
=====					
SON: **CIENTO VEINTICINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: 					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
COLO: 16577 - 841- 001-0.					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Febrero 13 de 2013 - 10:45:59					

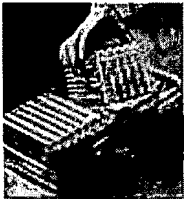


Ajudando as pessoas a
viverem vidas saudáveis

Product Catalog

Welcome to the BD (Becton, Dickinson and Company) Catalog of medical supplies, devices, laboratory equipment and diagnostic products.

Cell Cultureware
Product Number: 353936



[Safety Data Sheet](#)
[More information](#)
[Certificate of Analysis](#)

353936 - BD Falcon™ Clear 96-well Microtest™ Plate. Tissue-culture treated polystyrene, flat bottom, with lid. Packed in Ready-Stack bulk trays. (14/sp, 84/ca)

Key Product Features

Availability	US, Canada, Latin America, Europe, Australia, Asia Pacific, Japan
Product type	Plates
Brand	BD Falcon™
DNR (Latex) free?	Yes
Growth area	0.32 cm²
Growth surface	Tissue-culture treated
Lid	Yes
Material	Clear polystyrene
Notes	For assays not requiring cell attachment, see our Assay Plate products for additional plates and lids.
Shape	Flat-bottom
Size	96-well
Sterile?	Yes
Volume	370 µl

[Return to top of page](#)

353936 - BD Falcon™ Clear 96-well Microtest™ Plate. Tissue-culture treated polystyrene, flat bottom, with lid. Packed in Ready-Stack bulk trays. (14/sp, 84/ca)

Cross References

[Return to top of page](#)

353936 - BD Falcon™ Clear 96-well Microtest™ Plate. Tissue-culture treated polystyrene, flat bottom, with lid. Packed in Ready-Stack bulk trays. (14/sp, 84/ca)

Product Shipping and Handling Info.

Packaging Description	14/sp, 84/ca
Ordering / Contacts	Authorized Canadian distributors contact: BD 2100 Derry Road West Suite 100 Mississauga, Ontario L5N 0B3 Canada 866-979-9408 Outside US: contact the International Office nearest you

	US and Puerto Rico Customers contact: BD Customer Service 1 Becton Drive Franklin Lakes, NJ 07417 1-888-237-2762
Order Min	1 Case
Country of Origin	USA
Sterile?	Yes
How Sterilized	
Can be re-used?	No
Natural Rubber/Latex	Does not have Latex labeling Package does not have Latex Product has no Natural Rubber/Latex
Refrigerated shipping Information	Normal conditions
Batch Managed	Yes
Shelf Life	1825 Days

[Return to top of page](#)

353936 - BD Falcon™ Clear 96-well Microtest™ Plate. Tissue-culture treated polystyrene, flat bottom, with lid. Packed in Ready-Stack bulk trays. (14/sp, 84/ca)

Product Packaging Info.

Pkg level	EA	SP	CS
Quantity	1	14	84
Saleable?	No	Yes	Yes
EAN/UPC	382903539369	30382903539360	50382903539364
EAN Category	UC	IC	IC
Length	0.0 in	1.88 in	26.313 in
Width	0.0 in	1.022 in	14.313 in
Height	0.0 in	0.683 in	9.563 in
Weight	3.158 oz	1.184 lb	16.579 lb

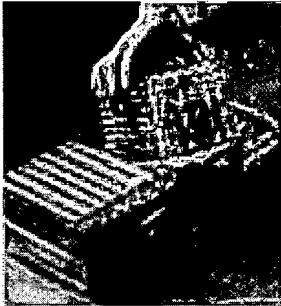
[Return to top of page](#)

BD
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ USA 07417
201.847.6800

Unless otherwise noted, BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2011 BD
[Site Map](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Permission Request](#) | [Trademarks](#) | [BD Worldwide](#)

Catálogo de productos

Bienvenido al catálogo de suministros médicos, dispositivos, equipo de laboratorio y productos de diagnóstico de BD (Becton, Dickinson and Company)



Placas de cultivo celular

Número de producto: 353936

[Ficha de datos de seguridad](#)

[Más información](#)

[Certificado de análisis](#)

353936 – BD Falcon™ Clear 96-well Microtest™ Plate. Poliestireno para cultivo de tejidos tratados, fondo plano, con tapa. Empacado en bandejas a granel apiladas. (14/sp, 84/ca)

Principales características del producto

Disponibilidad	EE.UU., Canadá, América Latina, Europa, Australia, Asia-Pacífico, Japón
Tipo de producto	Placas
Marca	BD Falcon™
¿Libre de DNR (Látex)?	Si
Área de crecimiento	0,32 cm ²
Superficie de crecimiento	Cultivo de tejidos tratados
Tapa	Si
Material	Poliestireno transparente
Notas	Para los ensayos que no requieren adhesión celular, vea nuestros productos Assay Plate para placas y tapas adicionales.
Forma	Fondo plano

Tamaño	96-pocillos
¿Esteril?	Si
Volumen	370 µL

[Regresar al inicio de la página](#)

353936 – BD Falcon™ Clear 96-well Microtest™ Plate. Poliestireno para cultivo de tejidos tratados, fondo plano, con tapa. Empacado en bandejas a granel apiladas. (14/sp, 84/ca)

Referencias cruzadas

[Regresar al inicio de la página](#)

353936 – BD Falcon™ Clear 96-well Microtest™ Plate. Poliestireno para cultivo de tejidos tratados, fondo plano, con tapa. Empacado en bandejas a granel apiladas. (14/sp, 84/ca)

Información del envío y manipulación del producto

Descripción de embalaje	14/sp, 84/ca
Pedido / Contactos	Contacto de distribuidores canadienses autorizados: BD 2100 Derry Road West Suite 100 Mississauga, Ontario L5N 0B3 Canadá 866-979-9408

Fuera de los EE.UU.: Contacte a [la Oficina Internacional más cercana](#)

Clientes de EE.UU. y Puerto Rico contactar a:

	Servicio al cliente BD
	1 Becton Drive
	Franklin Lakes, NJ 07417
	1-888-237-2762
Pedido min	1 caja
País de origen	EE.UU.
¿Estéril?	Si
Como fue esterilizado	
¿Puede reutilizarse?	No
Caucho/Látex natural	No tiene etiquetado de Látex
	El embalaje no tiene Látex
	El producto no tiene Caucho/Látex natural
Información de envío refrigerado	Condiciones normales
Lote gestionado	Si
Vida útil	1825 días
Regresar al inicio de la página	

353936 – BD Falcon™ Clear 96-well Microtest™ Plate. Poliestireno para cultivo de tejidos tratados, fondo plano, con tapa. Empacado en bandejas a granel apiladas. (14/sp, 84/ca)

Información de embalaje del producto

Nivel emb	EA	SP	CS
Cantidad	1	14	84
¿Vendible?	No	Si	Si
EAN/UPC	382903539369	30382903539360	50382903539364
Categoría EAN	UC	IC	IC
Largo	0,0"	1,88"	26,313"
Ancho	0,0"	1,022"	14,313"
Alto	0,0"	0,683"	9,563"

Peso 3,158 oz. 1,184 lb. 16,579 lb.

[Regresar al inicio de la página](#)

BD

1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ EE.UU. 07417
201-847-6800

Salvo indicación contraria, BD, el signo BD y todas las otras marcas son propiedad de Becton,
Dickinson and Company. © 2011 BD

English (UK) | English (US) | Français | D

thermo

SCIENTIFIC

nunc

Part of Thermo Fisher Scientific

Search

About Us

Custom Solutions

News

Products

Applications

Support

Ordering

Cor

Sorry, this browser isn't currently supported by the ASPxButton control.

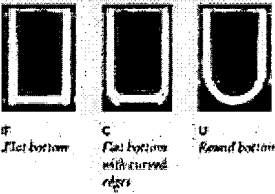
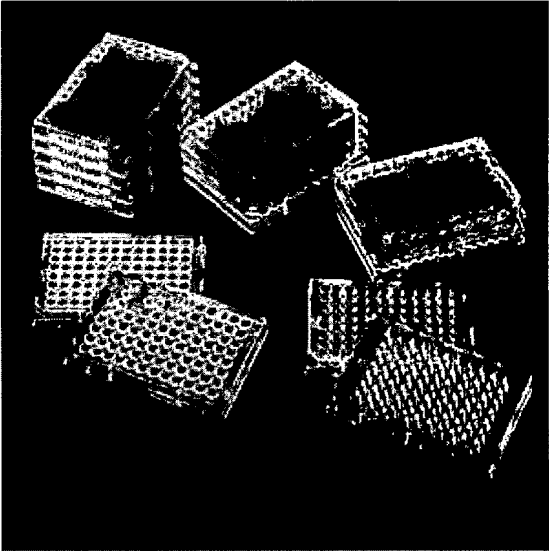
Sorry, this browser isn't currently supported by the ASPxButton control.

- Features
- Details
- Accessories
- Links

Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates

Clear

- Plates intended for quantitative and qualitative solid phase immuno assays (e.g. ELISA) and binding assays
- Choice of Surface
 - PolySorp™, with high affinity to molecules of a hydrophobic nature
 - MediSorp™, has a surface chemistry between PolySorp™ and MaxiSorp™. Provides low background signal with samples containing serum.
 - MaxiSorp™, with high affinity to molecules with mixed hydrophilic/hydrophobic domains
 - MultiSorp™, with high affinity to hydrophilic molecules
- Choice of F, C and U bottoms
- Raised rims on the wells
- Certified reproducibility of binding
- Alphanumeric orientation system
- Fit standard equipment
- Barcodes available on request



Details

Nunc-Immuno™ Plates
Polystyrene, without lids.
96 wells per plate.
Ext. dimensions 128 x 86 mm

Cat. No.	475094	456529	446140	475434	467320*	467340
Specifications	View	View	View	View	View	View
Configuration	F96	F96	C96	U96	F96	F96
Surface	PolySorp	PolySorp	PolySorp	PolySorp	MediSorp	MultiSorp
Design	Pinchbar	High Flange	Pinchbar	High Flange	High Flange	High Flange
Total volume, µl/well	400	400	350	300	400	400
Suggested working volume, µl/well	350	350	250	250	350	350
Total surface area, cm²/well	2.7	2.7	2.5	2.0	2.7	2.7
Barcode	-	-	-	-	-	-
Units per pack/case	5/60	10/180	5/60	5/60	5/60	5/60
Availability	Worldwide	Worldwide	Worldwide	Worldwide	Not Americas	Not Americas

* With certificate

Nunc-Immuno™ Plates

Visit Thermo Fisher Scientific | Privacy Statement | Terms and Conditions | Contact Us

©2010 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

45

Placas sólidas Immuno 96 MicroWell™

Transparente

- Placas destinadas para inmunoensayos cuantitativos y cualitativos en fase sólida (e.g. ELISA) y ensayos de unión.
- Opción de superficie
 - *PolySorp™, con gran afinidad a las moléculas de naturaleza hidrofóbica*
 - *MediSorp™, tiene una superficie química entre PolySorp™ y MaxiSorp™. Proporciona baja señal de fondo con muestras que contienen suero.*
 - *MaxiSorp™, con gran afinidad a las moléculas con dominios hidrofílicos/hidrofóbicos mixtos*
 - *MultiSorp™, con gran afinidad a las moléculas hidrofílicas*
- Opción de fondos F (fondo plano), C (fondo plano con bordes curvos), U (fondo redondo)
- Bordes levantados en los pocillos
- Reproducibilidad de unión certificada
- Sistema de orientación alfanumérico
- Equipo de ajuste estándar
- Códigos de barras disponibles a solicitud

Detalles

Placas Nunc-Immuno™

Poliestireno, sin tapas.

96 pocillos por placa

Dimensiones ext. 128 x 86 mm

Cat No.	475094	456529	446140	475434	467320*	467340
Especificaciones	Ver	Ver	Ver	Ver	Ver	Ver
Configuración	F96	F96	C96	U96	F96	F96
Superficie	PolySorp	PolySorp	PolySorp	PolySorp	MediSorp	MultiSorp
Diseño	Alzaprima	Reborde alto	Alzaprima	Reborde alto	Reborde alto	Reborde alto
Volumen total, µL/pocillo	400	400	350	300	400	400
Volumen de trabajo sugerido, µL/ pocillo	350	350	250	250	350	350
Área total de la superficie, cm ² / pocillo	2,7	2,7	2,5	2,0	2,7	2,7
Código de barras	-	-	-	-	-	-
Unidades por paquete/caja	5/60	10/180	5/60	5/60	5/60	5/60
Disponibilidad	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial	No en América	No en América

*Con certificado
Placas Nunc-Immuno™

48

Docket No.: 31203/30021A
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Stephen Poole et al.

Application No.: 11/613,866

Confirmation No.: 8436

Filed: December 20, 2006

Art Unit: 1647

For: MONOCYTE ACTIVATION TEST BETTER
ABLE TO DETECT NON-ENDOTOXIN
PYROGENIC CONTAMINANTS IN
MEDICAL PRODUCTS

Examiner: C. M. Woodward

DECLARATION UNDER 37C.F.R. 1.132 OF STEPHEN POOLE

I, Stephen Poole, do hereby declare as follows:

1. I am a co-inventor of the subject patent application. Currently, I am the Parenteral Sections Leader of the Biotherapeutics Group of the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). I have authored over 200 scientific journal articles. My curriculum vitae is appended hereto as Exhibit A.

2. I am a co-author of the scientific journal article entitled, "A rapid 'one-plate' in vitro test for pyrogens" which published in the *Journal of Immunological Methods* Vol. 274 (2003): 209-220 (a copy of which is appended hereto as Exhibit B; referred to hereinafter as "Poole et al."). Poole et al. describes an ELISA-based pyrogen detection assay in which pyrogen-free 96-well plates coated with pyrogen-free anti-cytokine antibodies or antibodies specific for endogenous mediators of the inflammatory response are used in conjunction with monocytes. In this assay, a test sample is contacted with the monocytes and, if the test sample includes a pyrogen, a cytokine or endogenous mediator is released by the monocytes and subsequently binds to the antibodies on the surface of the plate. The cytokine or endogenous mediator bound to the antibody is subsequently detected in the assay.

3. In the experiments described in Poole et al., a variety of microtiter

plates were used in the assay, including Dynex PF microtiter 'flat bottom' styrene 96 well plates, Dynex pyrogen-free (PF) microtiter 'U-bottom' styrene 96-well plates, Dynex (non PF) polyvinylcarbonate (PVC) microtiter 'U bottom' 96-well plates, Falcon Microtest tissue culture plate 96-well, Falcon Microtest III flexible 96-well assay plates, and Nunc-Immuno (nonPF) 96-well plates. However, none of the experiments described in Poole et al. included the use of microtiter plates with wells having a polypropylene coating or plates which were entirely made of polypropylene.

4. The results of Poole et al. demonstrated that neither the shape nor the coating or composition of the wells of the microtiter plates used in the assay had an affect on the ability of the assay to detect pyrogens. We reported this finding by stating (at page 213, first paragraph of the Results section of Poole et al.): "All of the different plate types used in the one-plate assays, e.g., 'flat bottom', 'U-bottom', styrene and PVC gave similar results."

5. After Poole et al. published and before the priority date of the subject patent application, we carried out a pyrogen detection assay similar to the one described in Poole et al. but changed the assay, such that polypropylene microtiter plates with non-flat wells were used. The use of the polypropylene microtiter plates with non-flat wells provided a significant improvement for the indirect detection of non-endotoxin pyrogens. The significant improvement is evidenced by, for example, the greater difference in the detection of IL-6 bound to IL-6-specific antibody (as represented by the absorbance at 450 nm) seen between the Extraneal positive and negative controls when polypropylene, non-flat wells were used in the assay (Figure 12A of the application), as compared to the difference among the two controls when polystyrene, flat wells were used in the assay (Figure 12B of the application). Given that neither the shape nor the coating or composition of the wells of the microtiter plates used in the assay made a difference in the studies described in Poole et al., we did not expect that the use of polypropylene microtiter plates with non-flat bottomed wells would provide such an improvement in the ability of the assay to detect non-endotoxin pyrogens.

6. I declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like are

Application No. 11/613,866

Docket No.: 31203/30021A

punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the above-identified application or any patent issuing thereon.

Signed:



Stephen Poole

Date: 12 January 2010

EXHIBIT A

CURRICULUM VITAE

NAME: Stephen Poole

POSITION: Parenterals Section Leader

QUALIFICATIONS: 1974 BSc (1st Class Hons) Pharmacology, London
1980 PhD Pharmacology, London

DATE OF BIRTH: 13 March 1952

APPOINTMENTS:

1972-1973	Research Assistant, Department of Pharmacology, Royal College of Surgeons of England
1974-1982	Research Scientist, Department of Pharmacology, Institute of Psychiatry, London
1982-2004	Scientist/Senior Scientist/Principal Scientist, National Institute for Biological Standards and Control, Endocrinology Division
2004-2006	Principal Scientist, National Institute for Biological Standards and Control, Immunology/Endocrinology Division
2006-to date	Section Leader, National Institute for Biological Standards and Control, Parenterals Section of Biotherapeutics Group

POSTS HELD AND OTHER RESPONSIBILITIES:

Member of:-

- HPA R&D Group
- MHRA Expert Advisory Group on Clinical Trials (of "higher risk" medicines and vaccines)
- EDQM Group MAT (Monocyte Activation Test for pyrogens)
- EDQM Group BET (Bacterial Endotoxins Test)
- EMA Group drafting guideline for pre-clinical cytokine release tests
- USP/EDQM/Japanese Pharmacopoeia/WHO Endotoxin Standardization Group

PUBLICATIONS

Some 200 peer-reviewed, PubMed-cited, publications, including two in the Journal *NATURE*. Numerous review articles and book chapters and co-authorship of: *Bacteria - Cytokine Interactions in Health and Disease* (Portland Press, 1998).

PATENTS

1. Peptides and pharmaceutical composition thereof in the treatment of pain.
Patent number: US538961 1995-02-14
2. Pharmaceutical preparation for the treatment of inflammatory processes.
Patent number: EP1027894 2000-08-16; US6399572 2002-06-04.
3. Pyrogenicity test for use with automated immunoassay systems.
Patent number: US6696261 2004-02-24.

SUMMARY OF SCIENTIFIC WORK:

A background in neuro, cardiovascular and immunopharmacology and cell biology and responsible for the evaluation of biological medicines and vaccines for more than 25 years. Has developed and applied novel cell-based assays for measuring pro-inflammatory activities of medicines and vaccines and their contaminants. One of these tests, the Monocyte Activation Test for pyrogens, will be introduced into the *Ph Eur* in April 2010.

Research interests in the mechanisms underlying inflammation, fever and pain. Research output reflected in some 200 peer-reviewed, PubMed-cited, publications, including two in the Journal *NATURE*, numerous review articles and book chapters and co-authorship of the book *Bacteria - Cytokine Interactions in Health and Disease* (Portland Press).

Responsible for the distribution of a variety of standards and European batch release of parenteral medicines.

EXHIBIT B



A rapid 'one-plate' in vitro test for pyrogens

Stephen Poole^{a,*}, Yogesh Mistry^a, Christine Ball^a, Rose E. Gaines Das^a,
Lisa Pieti Opie^b, Garry Tucker^b, Mehul Patel^b

^a National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QG, England, UK

^b Baxter Healthcare Corporation, 2545 Central Avenue, Suite FD-1, Boulder, CO 80301-2857, USA

Received 18 July 2002; received in revised form 24 September 2002; accepted 18 November 2002

Abstract

A rapid, 'one-plate' monocyte-activation test is described for detecting endotoxin and non-endotoxin pyrogens in parenteral medicinal products. The one-plate test offers useful gains over conventional 'two-plate' (cell culture plate + ELISA plate) tests in terms of its limit of detection, robustness, speed and cost. The 'one-plate' test is likely to be applicable to a wide range of products because it allows less time for product interference in the test. The 'one-plate' test utilises pyrogen-free anti-cytokine (interleukin (IL)-6 or tumour necrosis factor α (TNF α)) antibodies (Ab), coated and stabilised onto (pyrogen-free) 96-well plates. Monocytes/monocytic cells, endotoxin (lipopolysaccharides, LPS) standard or sample and (pyrogen-free) second (labelled) Ab are cultured together (usually for 2–4 h) on the Ab-coated plate and then the plate is washed and the ELISA completed. There is no transfer from one plate to another and no (further) incubations of (released) cytokine with, first, coating Ab and, then, developing Ab since these steps have already taken place during the initial cell culture. The rapid, 'one-plate' test is readily automated. The preferred readout is IL-6, which gives a limit of detection of 0.015 endotoxin units (EU)/ml with peripheral blood mononuclear cell (PBMNC), 0.03 EU/ml with diluted whole blood and 0.05 EU/ml with a monocytic cell line (MONO MAC 6).

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: One plate; In vitro test for pyrogens; Monocyte-activation test; Endotoxin; Interleukin-6; Tumour necrosis factor α

1. Introduction

Parenteral pharmaceutical products are required to be free from pyrogenic contamination. While a pyrogen may be defined as any substance that causes fever, the pyrogens of concern to the pharmaceutical industry are bacterial endotoxins (lipopolysaccharides, LPS) from Gram-negative bacteria since it is endotoxin that most frequently contaminates parenteral medicinal products (Mascoli and Weary, 1979a,b). Currently one of two Pharmacopoeial tests for pyrogenic contamination is applied to

Abbreviations: BET, bacterial endotoxins test; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EU, endotoxin units; HRP, horse radish peroxidase; HSA, human serum albumin; IL, interleukin; IU, international unit; LAL, Limulus amoebocyte lysate; LPS, lipopolysaccharide; OPD, 1, 2-phenylenediamine dihydrochloride orthophenylene diamine; PBMNC, peripheral blood mononuclear cell; S.E.M., standard error of the mean; TNF α , tumour necrosis factor α ; Tween 20, polyoxyethylene-sorbitan monolaurate; w/v, weight per volume.

* Corresponding author. Tel.: +44-1707-654753; fax: +44-1707-646730.

E-mail address: spoolc@nibsc.ac.uk (S. Poole).

0022-1759/02/\$ - see front matter © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/S0022-1759(02)00519-7

parenteral medicinal products. These are the rabbit pyrogen test and the bacterial endotoxins test (BET). As its name suggests, the rabbit pyrogen test detects endotoxin and other pyrogens, and involves measuring the rise in body temperature evoked in rabbits by the intravenous injection of a sterile solution of the substance to be examined. Again, as its name suggests, the bacterial endotoxins test (BET) detects only endotoxin. The principle of the BET is that endotoxin causes extracellular coagulation of the blood (haemolymph) of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. (Levin and Bang, 1964). Although the BET, which is also known as the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test, is gradually superseding the rabbit pyrogen test, thousands of rabbit pyrogen tests are still carried out each year around the world, in instances where the BET cannot be applied. Although generally reliable, both the rabbit pyrogen test and BET have shortcomings. The rabbit test is costly, not quantitative and uses experimental animals. The BET gives false negatives with certain products, can overestimate the pyrogen content of other products, does not detect pyrogens other than bacterial endotoxin (LPS), such as Gram-positive exotoxins, viruses and fungi (Dinarelli et al., 1984; Poole et al., 1988; Ray et al., 1990; Taktak et al., 1991; Fennrich et al., 1999) and also uses animals, albeit only as 'involuntary' blood donors.

The basis of the rabbit pyrogen test is the in vivo stimulation by exogenous pyrogens (usually endotoxin) of rabbit peripheral blood monocytes to produce the endogenous pyrogens, which cause fever. The major endogenous pyrogens are the cytokines tumour necrosis factor α (TNF α), interleukin-1 (IL-1 α and IL-1 β , two separate gene products), IL-6 and IL-8 (Dinarelli et al., 1999). Given the shortcomings of the rabbit pyrogen test and the BET, alternative in vitro tests for pyrogens based upon monocyte activation have been proposed. The basis of these 'monocyte-activation tests' or 'monocyte tests' is the exquisite sensitivity to exogenous pyrogen of human monocytes. In such tests, products are incubated with human peripheral blood monocytes or, more usually, the (monocyte-containing) peripheral blood mononuclear cell fraction (PBMNC) and the cell-conditioned media assayed for pyrogenic cytokines (Duff and Atkins, 1982;

Dinarelli et al., 1984; Poole et al., 1988, 1989a,b; Hansen and Christensen, 1990; Taktak et al., 1991; Biecker et al., 1994).

Unfortunately, the isolation of monocytes/PBMNC from whole blood is labour-intensive, time-consuming, technically sophisticated, requires expensive reagents and does not guarantee the isolation of cells in a non-activated state. This prompted the evaluation of various 'monocytic' cell lines, including MONO MAC 6 cells (Ziegler-Heitbrock et al., 1988) and THP-1 cells (Tsuchiya et al., 1980), and various cytokine readouts (Poole, 1989; Poole et al., 1989a,b; Taktak et al., 1991). Taktak et al. (1991) favoured a MONO MAC 6/IL-6 test and applied it to therapeutic human serum albumin (HSA) that had caused adverse reactions in recipients and detected pyrogenic contamination in the HSA that had not been detected in either the rabbit pyrogen test or the LAL test. Subsequently, sub-clones of the MONO MAC 6 and THP-1 cell lines have been used in in vitro test for pyrogens (Eperon and Jungi, 1996; Eperon et al., 1997; Peterbauer et al., 1999, 2000; Nakagawa et al., 2002).

Although cell lines avoid the need to make primary cultures of white blood cells, an in vitro test for pyrogens utilising a monocytic cell line has a number of disadvantages. These include: (i) the weeks/months required to establish, starting from a frozen aliquot, a sufficient number of cells of sufficient sensitivity (to pyrogen/endotoxin) to use in a test, (ii) inconsistencies in the sensitivities of cells of different passage numbers and different periods of time spent frozen, (iii) the need to co-stimulate with agents such as interferon- γ , or vitamin D (Taktak et al., 1991; Eperon and Jungi, 1996; Eperon et al., 1997; Peterbauer et al., 1999, 2000), (iv) verification of the continued presence on the cell line of the various receptor elements (e.g. CD14 and Toll-like receptors) necessary for the transduction of responses to endotoxin and other pyrogens (Means et al., 1999; Ulevitch, 1999; Takenuchi et al., 1999).

To avoid some of the disadvantages of test systems requiring the isolation of white blood cells or maintenance of monocytic cell lines, diluted whole blood may be used as the source of monocytes, since the monocytes in diluted whole blood respond to pyrogen/endotoxin by releasing pyrogenic cytokines (Desch et al., 1989; Finch-Arietta and

Cochran, 1991; Nerad et al., 1992; De Groote et al., 1992; Hartung and Wendel, 1996; Schins et al., 1996; Pool et al., 1998; Nakagawa et al., 2002). A monocyte test utilising diluted whole blood as the source of monocytes offers the considerable advantage of not requiring the isolation of monocytes/white blood cells and of culturing the monocytes in the presence of all of the constituents of the blood with which they usually reside. However, in common with all of the earlier variants of the *in vitro* test for pyrogens ('monocyte test'), the 'whole-blood *in vitro* test for pyrogens' suffers from the disadvantage of requiring two incubation steps, on two separate plates: an incubation of monocytes (as diluted blood) on one plate, followed by a second incubation of the monocyte-conditioned diluted blood on the ELISA plate used for the quantification of the cytokine measured.

The aims of the study were to assess the value of the one 'one-plate' *in vitro* monocyte-activation test for pyrogens to determine whether or not it offered significant gains over the conventional 'two-plate' (culture plate+ELISA plate) tests in terms of its quantification limit, robustness, speed and cost.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

The following materials were obtained from the sources indicated. The WHO international standards for bacterial endotoxin (LPS, ampoule code 94/580, identical to EC6 [US FDA], lot G [USP] and BRP3 [EP]), IL-1 β (86/680), IL-6 (89/548), and TNF α (87/650) were provided by NIBSC. The specific activities of these standards are endotoxin: 10000 IU (international units)=10000 EU (endotoxin units, FDA/USP)=1 μ g *E. coli* endotoxin/vial, IL-1 β : 100000 IU/1 μ g/ampoule, IL-6: 100000 IU/1 μ g/ampoule, TNF α : 40000 IU/1 μ g/ampoule. Matched pairs (for ELISA) of monoclonal antibodies (MAbs) to human IL-1 β and to human IL-6 (R&D Systems). Fragmin (Dalteparin, 10000 IU/ml, Pharmacia). Anti-human TNF α monoclonal antibody (MAb) 101-4 and sheep anti-TNF α serum were a gift from Dr. T Meager, Division of Immunobiology, NIBSC.

2.2. Consumables

Dynex PF microtiter 'flat bottom' styrene 96-well plates (#9305 Dynex Tech.); Dynex PF microtiter 'U-bottom' styrene 96-well plates (#2305); Dynex (non-PF) PVC microtiter 'U bottom' 96-well plates (#2401); Falcon Microtest tissue culture plate 96-well (#353072); Falcon Microtest III flexible 96-well assay plates (#3911, Beckton Dickinson Labware: 353072); Nunc-Immuno (non-PF) 96-well plates; centrifuge tubes (Falcon 2070 Blue Max); DEAE Trisacryl M, Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma, D-703); cell culture grade glycine (G-6388); hydrochloric acid, 0.1 M, sterile-filtered (Sigma, H-9892); cell culture grade polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20, P-2287); cell culture grade sucrose (S-1888); cell culture grade trehalose dihydrate (T-0167, Sigma Chemical); Gyrocent-L protein concentrators (Triple red Lab. Tech., #1433400); Nalgene cryogenic vials (#5000-0020); RPMI-1640 (GIBCO, Life Technologies), prepared sterile and pyrogen-free; sterile HSA (a dilution to 1% of clinical grade HSA, 4.5% w/v, Blood Products Laboratory, Elstree, Herts); pyrogen-free, sterile water for irrigation and 0.9% w/v NaCl (Baxter Healthcare). Other reagents/materials were purchased as sterile and pyrogen-free and glassware baked at 250 °C for 1 h.

2.3. Preparation of pyrogen-free anti-cytokine antibodies

Anti-IL-6 polyclonal antibodies were purified from a goat-anti-IL-6 serum by affinity chromatography on IL-6 (Taktak et al., 1991) using pyrogen-free wash buffer and elution buffer. The fractions were neutralised with pyrogen-free 1M sodium bicarbonate. The antibodies were concentrated on a Gyrocent-L centrifugal concentrator. Pyrogen-free biotinylated anti-IL-6 antibodies were prepared and purified as described previously (Taktak et al., 1991) except that pyrogen-free buffer was used. HRP-labelled anti-IL-6 antibodies, anti-TNF α monoclonal antibody (MAb) 101-4 (Meager et al., 1987), purified by FPLC, and sheep polyclonal anti-TNF α IgG (purified by HPLC or on DEAE Trisacryl M, Sigma) were made pyrogen-free using End-X (Associated of Cape Cod, USA). The solutions of pyrogen-free antibodies contained <0.03

EU (= IU)/ml of endotoxin contamination as measured in a LAL test.

2.4. Preparation and stabilisation of 96-well plates (pre)coated with pyrogen-free anti-cytokine antibodies

Non-sterile plates were rinsed extensively with pyrogen-free PBS. Ninety-six well plates of each type (see above) were coated with pyrogen-free anti-cytokine antibodies: goat anti-human IL-6 polyclonal antibodies, MAb 101-4 against human TNF α (1 μ g/ml, in either sterile PBS, pH 7.4, or sodium bicarbonate buffer, pH 8.2–9.6, 100 μ l/well, +4 °C, overnight). Plates were washed twice with sterile PBS + 0.1% Tween 20, then once with sterile PBS (without Tween). When the plates were not required immediately, a blocking/glazing solution (100 μ l/well of either sterile trehalose, 2% + sterile HSA, 1% or sterile sucrose, 5% + sterile HSA, 1%) was added for 1 h at room temperature. After 1 h, the blocking/glazing solution was carefully decanted and the plates were air-dried in a Class II 'sterile' cabinet for at least 4 h (usually overnight), sealed in plastic bags and stored at 4 °C.

2.5. Collection of blood

Twenty blood donors were included in the study. Seven were male and thirteen were female. The ages of the males ranged from 27 to 47 years with a mean of 36 years. The ages of the females ranged from 23 to 49 years with a mean of 34 years. All of the donors appeared to be in good health. None were taking NSAIDs, immunosuppressants, glucocorticoids or any other drugs known to influence the production of cytokines. Using a 20-ml syringe and a 21-gauge needle, 2–10 ml blood was drawn from the median cubital or cephalic vein of the left or right arm of donors and transferred immediately into 50 ml sterile, pyrogen-free centrifuge tubes (Falcon 2070 Blue Max) containing sufficient heparin (Fragmin, 10000 IU/ml, Pharmacia, diluted 1/10 with sterile, pyrogen-free saline) to give a concentration of 10 IU/ml in the blood. The blood was collected in the morning, held at room temperature and used within 1 h (typically 30 min) of its collection. The duration of short-term blood storage does not significantly affect IL-6 release (Schins et al., 1996).

2.6. Isolation of PBMNC and culture of PBMNC and MONO MAC 6 and THP-1 cells

Isolation of PBMNC and culture of PBMNC, MONO MAC 6 and THP-1 cells were as described previously (Taktak et al., 1991). Counts of viable cell numbers were made by taking an aliquot of 100 μ l of a cell suspension and adding 850 μ l RPMI and 50 μ l 0.4% w/v Trypan blue solution. The number of viable cells in this solution was counted using a haemocytometer. This procedure is described in detail in the Sigma (Biochemical and Reagents For Life Science Research) Catalogue 2000/2001, pp. 1848–1849.

2.7. Protocol for 'two-plate' in vitro test for pyrogens using PBMNC, MONO MAC 6 or THP-1 cells

Cultures (250 μ l) were set up in quadruplicate using 96-well plates. The 250 μ l volume comprised: samples/standards diluted in RPMI containing 2% AB serum (125 μ l) and cells at an initial concentration of two million cells/ml in RPMI containing 2% AB serum (125 μ l), giving a final concentration (in the wells) of one million cells/ml. The contents of the wells were mixed by swirling gently (without cross-contaminating wells) and incubated without vibration (to allow the cells to settle) at 37 °C for 2–24 h in an atmosphere of 5% CO₂ in air. At the end of the tissue culture incubation, the cell-conditioned culture medium above the cells was made homogeneous by aspirating and expelling 100 μ l three times before transferring 100 μ l aliquots of the medium from each of the wells of the tissue culture plate into the corresponding wells of the ELISA plate. Aliquots were taken for ELISA determinations of IL-6 (Taktak et al., 1991), or using a matched pair of MAbs to human IL-6 from R&D Systems, both assays giving similar results), TNF α (Meager et al., 1987), IL-1 β (ELISA developed using the antibodies described by Rafferty et al., 1991, or using a matched pair of MAbs to human IL-1 β from R&D Systems, or an IL-1 β ELISA kit kindly provided by DPC Biemann, all of which gave similar results). All of the ELISAs employed detected 62.5 pg/ml cytokine or less and showed good regression on dose over the range 62.5–1000 pg/ml, with CVs of the order of 7–10%.

2.8. Protocol for 'two-plate' in vitro test for pyrogens using human whole blood

Cultures (250 µl) of 20% human whole blood were carried out in quadruplicate using 96-well plates. To distribute cells evenly throughout the blood, the blood donation was swirled gently prior to the withdrawal of aliquots (5 ml) into a smaller tube (7 ml) from which aliquots (50 µl) were taken for addition to the culture plate. The additions per well were: RPMI (75 µl), blood (50 µl), endotoxin sample/standard in RPMI or saline (125 µl). The contents of the wells were mixed by swirling gently (without cross-contaminating wells) and incubated without vibration (to allow the cells to settle) at 37 °C for 2–24 h in an atmosphere of 5% CO₂ in air. At the end of the tissue culture incubation, 100 µl aliquots of clear supernatant from each well were carefully transferred into the corresponding wells of the ELISA plate. Aspiration of cells was avoided by supporting the assay plate such that it sloped down at an angle of about 45° from columns 1 to 12. The ELISAs were as described above in Section 2.7.

2.9. Protocol for 'one-plate' in vitro test for pyrogens using PBMNC, MONO MAC 6 or THP-1 cells

Cultures (250 µl) were carried out in quadruplicate using 96-well plates previously coated with pyrogen-free anti-IL-6 antibodies. The 250 µl volume comprised: samples/standards diluted in RPMI containing 2% AB serum (125 µl), pyrogen-free biotinylated anti-IL-6 antibodies (10 µl), cells at an initial concentration of two million cells/ml in RPMI containing 2% AB serum (115 µl), giving a final concentration (in the wells) of one million cells/ml. The contents of the wells were mixed by swirling gently (without cross-contaminating wells) and incubated without vibration (to allow the cells to settle) at 37 °C for 2–24 h in an atmosphere of 5% CO₂ in air. At the end of the incubation, cultures were aspirated and discarded (in accordance with local safety procedures) and plates were washed four times with wash/dilution buffer (Taktak et al., 1991). Subsequent steps were as described previously (Taktak et al., 1991). Briefly, avidin-HRP (in 100 µl) was added for 15 min at room temperature. OPD (in 100 µl) was added for 10–20 min (until sufficient colour devel-

oped). 1 M H₂SO₄ (150 µl/well) was added to stop the reaction. Optical densities were read at 490 nm. In some experiments, HRP-labelled anti-IL-6 antibodies were substituted for biotinylated anti-IL-6 antibodies to eliminate the avidin-HRP step and so reduce the number of steps required for the ELISA. The ELISA for IL-6 detected 62.5 pg/ml cytokine or less and showed good regression on dose over the range 62.5–4000 pg/ml, with CVs of the order of 7–10%.

2.10. Protocol for 'one-plate' in vitro test for pyrogens using human whole blood

Cultures (250 µl) of 20% human whole blood were carried out in quadruplicate using 96-well plates previously coated with pyrogen-free anti-cytokine (IL-6 or TNFα) antibodies. To distribute cells evenly throughout the blood, the blood donation was swirled gently prior to the withdrawal of aliquots (5 ml) into a smaller tube (7 ml) from which aliquots (50 µl) were taken for addition to the culture plate. The additions per well were: RPMI or saline (65 µl), blood (50 µl), biotinylated anti-cytokine (IL-6 or TNFα) antibodies (10 µl) and endotoxin sample/standard in RPMI or saline (125 µl). The contents of the wells were mixed by swirling gently (without cross-contaminating wells) and incubated without vibration (to allow the cells to settle) at 37 °C for 2–24 h in an atmosphere of 5% CO₂ in air. The steps following the incubation were as described above in Section 2.9. The ELISAs for IL-6 and TNFα detected 62.5 pg/ml cytokine or less and showed good regression on dose over the range 62.5–4000 pg/ml, with CVs of the order of 7–10%.

3. Results

All of the different plate types used in the one-plate assays, e.g. 'flat bottom', 'U-bottom', styrene and PVC gave similar results. Similarly, the different coating/blocking buffers gave similar results.

3.1. Comparison of one-plate and two-plate tests for pyrogens using PBMNC/IL-6

Stimulation of PBMNCs (10⁶ cells/ml) with endotoxin (LPS, 0–0.25 EU/ml=0–25 pg/ml) for 4 h evoked the dose-dependent release of immunoreactive

IL-6 into the PBMNC-conditioned medium (Fig. 1). With the one-plate format, the endotoxin–IL-6 dose–response curve was steeper and the limit of detection (0.015 EU/ml) lower than with the two-plate format (0.03 EU/ml). The limit of detection was calculated as $3.3 \times$ the standard deviation of the response divided by the slope of the calibration curve, as described in the ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996 (<http://www.mcdiurenet.com/EMEA/PDFs/Q2a.pdf>). Stimulation of cells for 24 h gave similar results except that the IL-6 values were increased approximately two-fold (data not shown).

3.2. Comparison of one-plate and two-plate tests for pyrogens using monocytic cell lines

Stimulation of MONO MAC 6 cells (10^6 cells/ml) with endotoxin (LPS, 0–0.8 EU/ml = 0–80 pg/ml) for 24 h evoked the dose-dependent release of immunoreactive IL-6 into the cell-conditioned medium (Fig. 2).

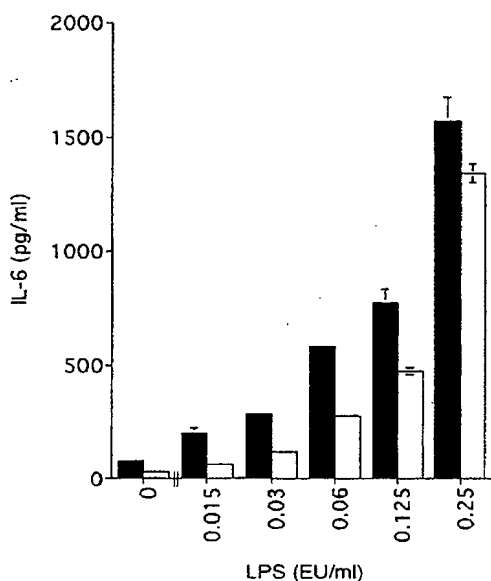


Fig. 1. Comparison of 'one-plate' (filled columns) and 'two-plate' (open columns) in vitro tests for pyrogens using PBMNCs (10^6 cells/ml) stimulated with endotoxin (LPS, 0–0.25 EU/ml = 0–25 pg/ml) for 4 h. Values for IL-6 are means of quadruplicates $\pm$ S.E.M. The experiment is representative of three independent experiments, each using PBMNCs from a different donor.

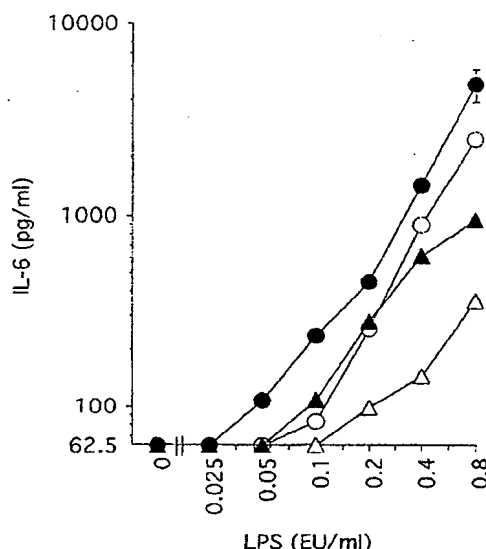


Fig. 2. Comparison of 'one-plate' and 'two-plate' in vitro tests for pyrogens using MONO MAC 6 cells and THP-1 cells. Release of IL-6 by MONO MAC 6 cells (circles) and THP-1 cells (triangles) stimulated with endotoxin (LPS, 0–0.8 EU/ml = 0–80 pg/ml) using either the 'one-plate' format (filled symbols) or the 'two-plate' format (open symbols). Values for IL-6 are means of quadruplicates $\pm$ S.E.M. The experiment is representative of three independent experiments, each using cells of a different passage number.

With the one-plate format, the endotoxin–IL-6 dose–response curve was steeper and the limit of detection (0.05 EU/ml) lower than with the two-plate format (0.1 EU/ml). Similar results were obtained with THP-1 cells: stimulation of THP-1 cells (10^6 cells/ml) with endotoxin (LPS, 0–0.8 EU/ml = 0–80 pg/ml) for 24 h evoked the dose-dependent release of immunoreactive IL-6 into the cell-conditioned medium (Fig. 2). Again, with the one-plate format, the endotoxin–IL-6 dose–response curve was steeper and the limit of detection (0.1 EU/ml) lower than with the two-plate format (0.2 EU/ml).

3.3. Release of $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β and IL-6 by whole blood (20%) stimulated with endotoxin in a two-plate test

Stimulation of whole blood (diluted 1/5 to 20% with saline) with endotoxin (LPS, 0–4 EU/ml = 0–400 pg/ml) for 4 h evoked the release of immunoreactive $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , and IL-6 into the blood (Fig. 3).

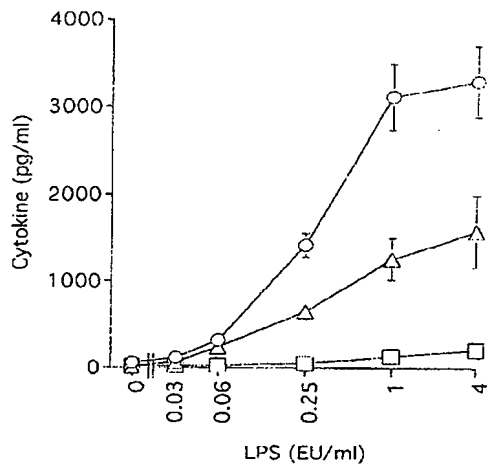


Fig. 3. Release of cytokines by whole blood stimulated with endotoxin (LPS) in a one-plate test. Release of IL-1 β (squares), TNF α (triangles), and IL-6 (circles) by whole blood (diluted 1/5 to 20% with RPMI) stimulated with endotoxin (LPS, 0–4 EU/ml=0–400 pg/ml) for 4 h. Values for cytokines are means $\pm$ S.E.M.s of six independent experiments, each using blood from a different donor.

The responses for each cytokine were dose-dependent and the relative concentrations of the cytokines (pg/ml) released for a given dose of endotoxin had the relation IL-6>TNF α >IL-1 β . A similar pattern of cytokine release was obtained with 24-h stimulation with endotoxin (data not shown).

3.4. Comparison of one-plate and two-plate whole blood tests for pyrogens with IL-6 as the readout

Stimulation of human whole blood (diluted 1/5 to 20% with saline) with endotoxin (LPS, 0–4 EU/ml=0–400 pg/ml) for 4 h evoked the dose-dependent release of immunoreactive IL-6 into the blood (Fig. 4). With the one-plate format, the endotoxin–IL-6 dose–response curves were steeper and the limit of detection (0.03 EU/ml) lower than with the two-plate format (0.06 EU/ml).

3.5. Comparison of one-plate and two-plate whole blood tests for pyrogens with TNF α as the readout

Stimulation of human whole blood (diluted 1/5 to 20% with saline) with endotoxin (LPS, 0–4 EU/ml=0–400 pg/ml) for 2 h evoked the dose-dependent

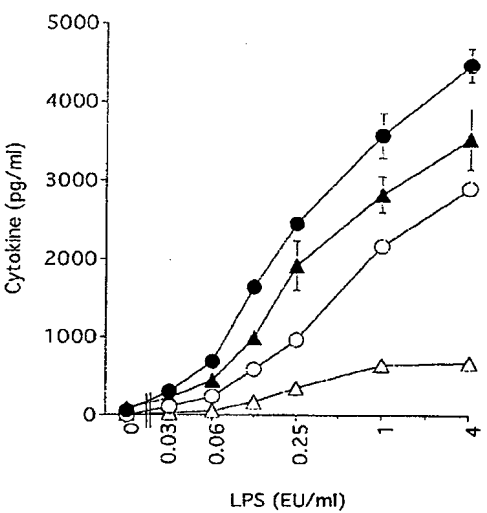


Fig. 4. Comparison of 'one-plate' and 'two-plate' whole blood tests for pyrogens with IL-6 and TNF α as the readouts. Release of IL-6 (circles) and TNF α (triangles) by whole blood (diluted 1/5 to 20% with saline) stimulated with endotoxin (LPS, 0–4 EU/ml=0–400 pg/ml) for 2 h (TNF α) or 4 h (IL-6) using either the 'one-plate' format (filled symbols) or the 'two-plate' format (open symbols). Values for TNF α and IL-6 are means of quadruplicates $\pm$ S.E.M. The experiment is representative of three independent experiments, each using blood from a different donor.

release of immunoreactive TNF α (Fig. 4). With the one-plate format, the endotoxin–TNF α dose–response curve was steeper and the limit of detection (0.03 EU/ml) lower than with the two-plate format (0.06 EU/ml).

3.6. Spike recoveries for HSA spiked with endotoxin

Spike recoveries (%) for LPS (2.5 EU/ml) added to HSA (4.5%) and diluted 1/10 for testing with whole blood (20%, 4-h culture) are given in Table 1. In two-

Table 1
Spike recoveries (%) for LPS added to HSA (4.5%) and diluted 1/10 for testing with whole blood (20%, 4-h culture)

Test type	Readout	LPS spike (EU/ml)	Spike recovery %
Two-plate	TNF α	2.5	73 $\pm$ 6 (n=11)
Two-plate	IL-1 β	2.5	49 $\pm$ 13 (n=6)
Two-plate	IL-6	2.5	64 $\pm$ 8 (n=13)
One-plate	IL-6	2.5	87 $\pm$ 13 (n=8)

Values are means $\pm$ S.E.M.

plate tests with TNF α as readout, LPS spike recovery was $73 \pm 6\%$, compared with $64 \pm 8\%$ with IL-6 as the readout and just $49 \pm 13\%$ with IL-1 β as the readout. In one-plate tests with IL-6 as readout, spike recovery increased markedly to $87 \pm 13\%$.

4. Discussion

In the 20 years since an in vitro test for pyrogens ('monocyte test') was first suggested (Duff and Atkins, 1982), several different test systems have been described. The sources of monocytes/monocytic cells have included purified monocytes, PBMNC, monocytic cell lines and diluted whole blood and the chosen readouts have included TNF α , IL-1 β , IL-6, and neopterin (reviewed by Poole and Gaines Das, 2001). With monocytes, PBMNC and monocytic cells, the preferred readout is usually IL-6 because IL-6, unlike IL-1 β and TNF α , is secreted entirely into the cell-conditioned medium in large quantities, thereby permitting its complete estimation (Poole et al., 1989a,b; Taktak et al., 1991). In contrast to IL-6, immunoreactive TNF α and IL-1 β remain largely intracellular, raising the possibility that test preparations affecting cell-permeability might be more likely to interfere in the tests with (immunoreactive) TNF α or IL-1 β as the readout, rather than IL-6. Also, certain pro-inflammatory bacterial components stimulate the production of IL-6 but not TNF α and IL-1 β (Reddi et al., 1996).

In a recent study using whole blood (Nakagawa et al., 2002), it was reported that the structurally diverse pyrogens endotoxin, peptidoglycan, *Staphylococcus aureus* Cowan 1 and poly(I.C) all stimulated the release of more IL-6 than either TNF α or IL-1 β (values given in pg/ml). Moreover, IL-6 was induced by lower concentrations of each pyrogen than were required to induce TNF α and IL-1 β . Consistent with these data, the concentrations of IL-6 detected in peripheral blood following administration of endotoxin in man were greater than the concentrations of TNF α and IL-1 β (Luheshi and Rothwell, 1996; Bruunsgaard et al., 1999; Suffredini et al., 1999). Indeed, there is good evidence to suggest that IL-6 is the principal circulating endogenous pyrogen in man (Dinarello, 1999) and experimental animals (Dinarello et al., 1999; Cartmell et al., 2000) and best

correlates with pyrogenic activity in the blood (Rothwell, 1990; Kluger, 1991; Buck et al., 1994; Rothwell and Hopkins, 1995; Lin and Huang, 1998; Otto et al., 1999; Dinarello, 1999). The pyrogenic activity of TNF α and IL-1 appears to be largely IL-6-dependent (Chai et al., 1996; Luheshi and Rothwell, 1996; Sundgren-Andersson et al., 1998; Zetterstrom et al., 1998; Cartmell et al., 2000).

With IL-6 as the readout, the one-plate format offered a lower limit of detection than conventional two-plate assays. With PBMNC, the limit of detection was 0.015 EU/ml even when the duration of the cell culture was just 4 h, and limits of detection of 0.05 and 0.1 EU/ml were obtained with the monocytic cell lines MONO MAC 6 and THP-1, respectively, with cell cultures of 24-h duration. The advantage of these lower limits of detection is that they permit larger dilutions of test samples to overcome interference by the samples in the test.

The use of (diluted) human whole blood as a source of monocytes has been described by a number of groups, including Desch et al., 1989; Finch-Arietta and Cochran, 1991; Nerad et al., 1992; De Groote et al., 1992; Hartung and Wendel, 1996; Schins et al., 1996; Pool et al., 1998; Fennrich et al., 1999; Jahnke et al., 2000; Nakagawa et al., 2002. The major differences between the different protocols utilising whole blood are the cytokine chosen as the readout (measured variable), the duration of the blood culture, and the inclusion/omission of interferon- γ as co-stimulus (priming agent). The preferred readout is IL-1 β (Hartung and Wendel, 1996; Fennrich et al., 1999; Jahnke et al., 2000) or IL-6 (Pool et al., 1998; Nakagawa et al., 2002), although TNF α also would appear to be suitable (Desch et al., 1989; Finch-Arietta and Cochran, 1991; De Groote et al., 1992; Hartung and Wendel, 1996). The duration of incubation is determined to some extent by convenience but also by the choice of readout. A short (4 h) incubation of (diluted) blood with a very large dose of endotoxin (10 μ g/ml) stimulated the production of IL-1 β (and TNF α), whereas a longer incubation (24 h) of (diluted) blood was required for much smaller doses of endotoxin (1 pg/ml and above) to stimulate the production of IL-1 β (and TNF α , Hartung and Wendel, 1996). A lengthy incubation (18 h), in the presence of interferon- γ , was also favoured when IL-6 was the readout (Pool et al., 1998).

In the present study, the concentrations of cytokines (pg/ml) produced by (diluted) whole blood stimulated with endotoxin for 4–24 h had the rank order IL-6>TNF α >IL-1 β , consistent with the recent study of Nakagawa et al. (2002). Also consistent with the data of the Japanese group was the finding that IL-6 was induced by smaller concentrations of LPS than was required to induce TNF α and IL-1 β . To ensure that the values for IL-1 β were not being underestimated, measurements were made using three independent ELISA systems, all of which gave similar results. Regarding the recovery of an endotoxin spike of 2.5 EU/ml in HSA (4.5% w/v), the best endotoxin spike recoveries in two-plate assays using whole blood (20%, 4 h) were obtained with TNF α as readout, followed by IL-6 and IL-1 β . In 4-h whole blood tests with IL-6 as readout, the one-plate format offered a useful improvement in endotoxin spike recovery (from 64% to 87%) for the endotoxin spike of 2.5 EU/ml in HSA.

The rabbit pyrogen test can be completed in less than 4 h, whereas a 'two-plate' *in vitro* test for pyrogens involves a 4-h incubation of monocytes/monocytic cells and product followed by an ELISA requiring a second incubation of cytokine on the capture antibody. Since the *in vitro* test for pyrogens is intended as a replacement for the rabbit pyrogen test, we sought to develop a version of this test, the 'one-plate' test, that could be completed in about the time taken to carry out a rabbit pyrogen test. The one-plate test utilises pyrogen-free anti-cytokine (IL-6 or TNF α) antibodies (Ab) coated and stabilised onto (pyrogen-free) 96-well plates. Diluted blood, endotoxin standard/sample and (pyrogen-free) biotinylated Ab are cultured together (usually for 2–4 h, depending upon the readout) on the Ab-coated plate and then the plate is washed and the ELISA completed. There is no transfer from one plate to another and no (further) incubations of (released) cytokine with, first, coating Ab and, then, developing Ab since these steps have already taken place during the initial culture. The one-plate *in vitro* test for pyrogens with whole blood as the source of monocytes and IL-6 as the readout can be carried out in 5 h from the time when the blood is drawn and, with TNF α as the readout, in just 3 h. With IL-6 as the readout, there is a 4-h culture of blood + product and with TNF α , this can be reduced to 2 h.

In addition to improved robustness (endotoxin spike recovery), the one-plate format also offered improvements in the limit of detection with whole blood as the source of monocytes. With whole blood/IL-6/4 h and whole blood/TNF α /2 h combinations, the limit of detection was 0.03 EU/ml. With IL-6 as the readout, the improved limit of detection of the one-plate format is likely to be a consequence of the removal/neutralisation of IL-6 (as it is produced) by the capture Ab and second Ab. In monocytes, endotoxin-stimulated TNF α and IL-1 β stimulate the production of IL-6, which inhibits further production of TNF α and IL-1 β (Schindler et al., 1990). Consequently, the removal/neutralisation of the IL-6 removes the negative feedback exerted by the released IL-6, which leads to the production of more TNF α and IL-1 β , which stimulate the production of more IL-6. With TNF α as the readout, the improvement may be a consequence of the capture by the anti-TNF α (coating) antibody (on the plate) of monocytes expressing the transmembrane form of TNF α (Grell et al., 1995), permitting the measurement of both cell-associated and released TNF α .

TNF α has an advantage as the readout in a one-plate test for pyrogens because of the shorter incubation time required for its release (2 vs. 4 h for IL-6). This makes the TNF readout particularly suitable for 'in process' pyrogen testing. However, the choice of IL-6 as the readout, in addition to the advantages noted above, has the advantage, with whole blood as the source of monocytes, to 'screen out' donors not in good health who may have aberrant responses. Blood cultures in the absence of added endotoxin contained concentrations of immunoreactive TNF α and IL-1 β close to or below the detection limits of the ELISAs used to detect them. In contrast, concentrations of immunoreactive IL-6 were detectable in these cultures. For healthy donors, concentrations of immunoreactive IL-6 were below 200 pg (20 IU)/ml (typically 50 pg/ml or less) but in donors who had recently recovered from minor viral or bacterial infections basal (i.e. unstimulated), concentrations of IL-6 sometimes exceeded 200 pg/ml and responses to added endotoxin were generally smaller for a given dose of endotoxin than for the blood of healthy donors (Poole, unpublished data). These findings accord with reports that plasma concentrations of immunoreactive IL-6 (unlike those of TNF α and IL-1 β) are likely to be increased in indi-

viduals not in good health (Buck et al., 1994; Lin and Huang, 1998; Otto et al., 1999). Consequently, the choice of IL-6 as the measured variable for a test using whole blood as the source of monocytes permits the identification and 'screening out' (albeit retrospectively) of donors who are not in good health, even though they may feel well enough to serve as a blood donor for the test. Based on the data collected for this study, a 'cut-off' value of 200 pg (20 IU)/ml for basal (unstimulated) immunoreactive IL-6 release is proposed for the rejection of test data.

The one-plate format will facilitate both the acceptance and automation of the in vitro test for pyrogens. While the pyrogens that contaminate parenteral medicinal products are almost invariably endotoxins, which rapidly stimulate cytokine production, some 'non-endotoxin' pyrogens can take longer to stimulate cytokine production (Fennrich et al., 1999; Hartung et al., 2001). Although these non-endotoxin pyrogens are unlikely contaminants of parenteral medicinal products, a culture of longer duration than 4 h may be required to ensure freedom from contamination with 'non-endotoxin' pyrogens. However, even for tests requiring a >4-h culture, many of the advantages (robustness, improved limit of detection, convenience, cost) of the one-plate format will still apply. The next challenge for scientists working in this area is to find an alternative to assays requiring human blood, which has the disadvantage of requiring laboratory workers to collect and work with a material that may contain infectious agents, and to cell lines that, starting from a frozen aliquot, can require weeks/months to be suitable for use in a test.

Acknowledgements

The authors are indebted to Mrs. Lynn Weller (Division of Haematology, NIBSC) for taking blood samples and to Dr. Tony Meager (Division of Immunobiology, NIBSC) for providing the anti-TNF α antibodies.

References

- Bloeker, W.K., de Groot, E.M., den Boer, P.J., Biessels, P.T., Aarden, L.A., Bakker, J.C., 1999. Measurement of interleukin-6 production by monocytes for in vitro safety testing of hemoglobin solutions. *Artif. Cells, Blood Substitutes, Immobilization Biotechnol.* 22, 835.
- Bruunsgaard, H., Pedersen, A.N., Schroll, M., Skinhoj, P., Pedersen, B.K., 1999. Impaired production of proinflammatory cytokines in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation in elderly humans. *Clin. Exp. Immunol.* 118, 235.
- Buck, C., Bundschu, J., Gallati, H., Bartmann, P., Pohlandt, F., 1994. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics* 93, 54.
- Cartmell, T., Poole, S., Turnbull, A.V., Rothwell, N.J., Luheshi, G.N., 2000. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J. Physiol.* 526, 653.
- Chai, Z., Gatti, S., Toniatti, C., Poli, V., Bartfai, T., 1996. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183, 311.
- De Groote, D., Zangerle, P.F., Gevaert, Y., Fassotte, M.F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F., Pirenne, J., Gathy, R., Lopez, M., Dchart, I., 1992. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood: I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 4, 239.
- Desch, C.E., Kovach, N.L., Present, W., Broyles, C., Harlan, J.M., 1989. Production of human tumor necrosis factor from whole blood ex vivo. *Lymphokine Res.* 8, 141.
- Dinarello, C.A., 1999. Cytokines as endogenous pyrogens. *J. Infect. Dis.* 179 (Suppl. 2), S294.
- Dinarello, C.A., O'Connor, J.V., LoPreste, G., Swift, R.L., 1984. Human leukocyte pyrogen test for detection of pyrogenic material in growth hormone produced by recombinant *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 20, 323.
- Dinarello, C.A., Gatti, S., Bartfai, T., 1999. Fever: links with an ancient receptor. *Curr. Biol.* 9, R147.
- Duff, G.W., Atkins, E., 1982. The detection of endotoxin by in vitro production of endogenous pyrogen: comparison with amoebocyte lysate gelation. *J. Immunol. Methods* 52, 323.
- Eperon, S., Jungi, T.W., 1996. The use of human monocytoic lines as indicators of endotoxin. *J. Immunol. Methods* 194, 121.
- Eperon, S., De Groote, D., Werner-Felmayer, G., Jungi, T.W., 1997. Human monocytoic cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and Limulus amoebocyte lysate assay. *J. Immunol. Methods* 207, 135.
- Fennrich, S., Fischer, M., Hartung, T., Lexa, P., Montag-Lessing, T., Sonntag, H.G., Weigandt, M., Wendel, A., 1999. Detection of endotoxins and other pyrogens using human whole blood. *Dev. Biol. Stand.* 101, 131.
- Finch-Arctta, M.B., Cochran, F.R., 1991. Cytokine production in whole blood ex vivo. *Agents Actions* 34, 49.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Claus, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793.
- Hansen, E.W., Christensen, J.D., 1990. Comparison of cultured human mononuclear cells, Limulus amoebocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens. *J. Clin. Pharm. Ther.* 15, 425.
- Hartung, T., Wendel, A., 1996. Detection of pyrogens using human whole blood. *In Vitro Toxicol.* 9, 353.

- Hartung, T., Aaberge, I., Berthold, S., Carlin, G., Charton, E., Coecke, S., Fennrich, S., Fischer, M., Gommer, M., Halder, M., Haslov, K., Jahnke, M., Montag-Lessing, T., Poole, S., Schechtman, L., Wendel, A., Werner-Felmayer, G., 2001. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction: the report and recommendations of ECVM workshop 43. *Altern. Lab. Anim.* 29, 99.
- Jahnke, M., Weigand, M., Sonntag, H.-G., 2000. Comparative testing for pyrogens in parenteral drugs using the human whole blood pyrogen test, the rabbit in vivo pyrogen test and the LAL test. *Eur. J. Parenter. Sci.* 5, 39.
- Kluger, M.J., 1991. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* 71, 93.
- Levin, J., Bang, F.B., 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 155, 337.
- Lin, S.J., Huang, J.L., 1998. Circulating interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and tumor necrosis factor-alpha in children with febrile infection—a comparison with C-reactive protein. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 16, 105.
- Luheshi, G., Rothwell, N., 1996. Cytokines and fever. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 109, 301.
- Mascoli, C.C., Weary, M.E., 1979a. Limulus amoebocyte lysate (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectable products and medical devices: advantages to manufacturers and regulatory officials. *J. Parenter. Drug Assoc.* 33, 81.
- Mascoli, C.C., Weary, M.E., 1979b. Applications and advantages of the Limulus amoebocyte lysate (LAL) pyrogen test for parenteral injectable products. *Prog. Clin. Biol. Res.* 29, 387.
- Meager, A., Parti, S., Leung, H., Peil, E., Mahon, B., 1987. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of recombinant human tumour necrosis factor (rTNF). *Hybridoma* 6, 305.
- Means, T.K., Lien, E., Yoshimura, A., Wang, S., Golenbock, D.T., Fenton, M.J., 1999. The CD14 ligands lipopolysaccharide and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol.* 163, 6748.
- Nakagawa, Y., Maeda, H., Murai, T., 2002. Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 588.
- Nerad, J.L., Griffiths, J.K., Van der Meer, J.W., Endres, S., Poutsika, D.D., Keusch, G.T., Bennish, M., Salam, M.A., Dinarello, C.A., Cannon, J.G., 1992. Interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-1 receptor antagonist, and TNF alpha production in whole blood. *J. Leukocyte Biol.* 52, 687.
- Otto, G., Braconier, J., Andreasson, A., Svanborg, C., 1999. Interleukin-6 and disease severity in patients with bacteremic and nonbacteremic febrile urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* 179, 172.
- Peterbauer, A., Werner, E.R., Werner-Felmayer, W., 1999. Neopterin and nitrite in supernatants from interferon-gamma-treated monocyte cell lines: a tool to identify bacterial pyrogens. *Pteridines* 10, 112.
- Peterbauer, A., Eperon, S., Jungi, T.W., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., 2000. Interferon-gamma-primed monocyte cell lines: optimizing their use for in vitro detection of bacterial pyrogens. *J. Immunol. Methods* 233, 67.
- Pool, E.J., Johaar, G., James, S., Petersen, L., Bouic, P., 1998. The detection of pyrogens in blood products using an ex vivo whole blood culture assay. *J. Immunoassay* 19, 95.
- Poole, S., 1989. 'Monocyte test' for pyrogen. *Pharmeuropa* 1 (5), 238.
- Poole, S., Gaines Das, R.E., 2001. Towards a 'human pyrogen test'. *J. Parenter. Sci.* 6 (2), 63.
- Poole, S., Thorpe, R., Meager, A., Hubbard, A.R., Gearing, A.J.H., 1988. Detection of pyrogen by cytokine release. *Lancet* 8577, 130.
- Poole, S., Bristow, A.F., Selkirk, S., Rafferty, B., 1989a. Development and application of radioimmunoassays for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta. *J. Immunol. Methods* 116, 259.
- Poole, S., Selkirk, S., Rafferty, B., Meager, A., Thorpe, R., Gearing, A., 1989b. Assay of pyrogenic contamination in pharmaceuticals by cytokine release. *Proceedings of the European Workshop on detection and quantification of pyrogen. Pharmeuropa* 1 (Special issue) 17.
- Rafferty, B., Mower, J.A., Taktak, Y.S., Poole, S., 1991. Measurement of cytokine production by the monocytic cell line Mono Mac 6 using novel immunoradiometric assays for interleukin-1 beta and interleukin-6. *J. Immunol. Methods* 144, 69.
- Ray, A., Redhead, K., Selkirk, S., Poole, S., 1990. Variability in LPS composition, antigenicity and reactivity of phase variants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 79, 211.
- Reddi, K., Nair, S.P., White, P.A., Hodges, S., Tabona, P., Meghji, S., Poole, S., Wilson, M., Henderson, B., 1996. Surface-associated material from the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* contains a peptide which, in contrast to lipopolysaccharide, directly stimulates fibroblast interleukin-6 gene transcription. *Eur. J. Biochem.* 236, 871.
- Rothwell, N.J., 1990. Mechanisms of the pyrogenic actions of cytokines. *Eur. Cytokine Network* 1, 211.
- Rothwell, N.J., Hopkins, S.J., 1995. Cytokines and the nervous system: II. Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 18, 130.
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S.C., Dinarello, C.A., 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), and tumour necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75, 40.
- Schins, R.P.F., van Hartingsveldt, B., Borm, P.J.A., 1996. Ex vivo cytokine release from whole blood. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48, 494.
- Suffredini, A.F., Hochstein, H.D., McMahon, F.G., 1999. Dose-related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a new clinical lot of *Escherichia coli* O:113 endotoxin. *J. Infect. Dis.* 179, 1278.
- Sundgren-Andersson, A.K., Ostlund, P., Bartfai, T., 1998. IL-6 is essential in TNF-alpha-induced fever. *Am. J. Physiol.* 275 (6 Pt 2), R2028.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11, 443.
- Taktak, Y.S., Selkirk, S., Bristow, A.F., Carpenter, A., Ball, C., Rafferty, B., Poole, S., 1991. Assay of pyrogens by interleu-

- kin-6 release from monocytic cell lines. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 578.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., 1980. Establishment and characterisation of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 147.
- Ulevitch, R.J., 1999. Toll gates for pathogen selection. *Nature* 401 (6755), 755.
- Zetterstrom, M., Sundgren-Andersson, A.K., Ostlund, P., Bartfai, T., 1998. Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856, 48.
- Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Reichmuller, G., 1988. Establishment of a human cell line (MONO MAC 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* 41, 465.

**EN LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS
UNIDOS**

En lo relativo a la Solicitud de
Patente de: Stephen Poole et al.

Solicitud No.: 11/613,866

Confirmación No.: 8436

Presentada: 20 de diciembre de 2006

Unidad de Arte: 1647

Para: PRUEBA DE ACTIVACIÓN DE
MONOCITOS, CAPAZ DE DETECTAR EN MEJOR
FORMA CONTAMINANTES PIROGÉNICOS DISTINTOS
DE ENDOTOXINA EN PRODUCTOS MÉDICOS

Examinador: C. M. Woodward

DECLARACIÓN BAJO 37C.F.R. 1.132 DE STEPHEN POOLE

Yo, Stephen Poole, declaro por el presente lo siguiente:

1. Soy co-inventor de la solicitud de patente en cuestión. Actualmente soy Director de las Secciones de Medicinas Parenterales del Grupo de Bioterapéutica del Instituto Nacional para Normas Biológicas y Control - *Parenteral Sections Leader of the Biotherapeutics Group of the National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC). He escrito más de 200 artículos aparecidos en revistas científicas. Mi hoja de vida se adjunta al presente como Anexo A.

2. Soy co-autor del artículo aparecido en una revista científica titulado "Una prueba rápida *in vitro* con 'una sola placa' para pirógenos", que se publicó en el *Journal of Immunological Methods* (*Revista de Métodos Inmunológicos*) Vol. 274 (2003): 209-220 (una copia del cual se adjunta al presente como Anexo B; en adelante "Poole et al."). Poole et al. describe un análisis de detección de pirógenos basado en ELISA, en el cual placas de 96 pocillos, libres de pirógenos, recubiertas con anticuerpos anti-citocina libres de pirógenos o anticuerpos específicos para mediadores endógenos de la respuesta

inflamatoria, se usan conjuntamente con monocitos. En este análisis, una muestra de prueba se pone en contacto con los monocitos y, si la muestra de prueba incluye un pirógeno, una citocina o mediador endógeno se libera por los monocitos y, seguidamente, se une a los anticuerpos en la superficie de la placa. La citocina o mediador endógeno ligado al anticuerpo se detecta posteriormente en el análisis.

3. En los experimentos descritos en Poole et al., se empleó en el análisis una variedad de placas de microtitulación, incluyendo placas de microtitulación de 96 pocillos, de estireno, con 'fondo plano', Dynex PF, placas de microtitulación de 96 pocillos, con 'fondo en U', libres de pirógenos (PF – *pyrogen-free*), Dynex, placas de microtitulación de 96 pocillos, de carbonato de polivinilo (PVC), con 'fondo en U', (no libres de pirógenos – *non-PF*), Dynex, placa de cultivo de tejido Falcon Microtest de 96 pocillos, placas de análisis flexibles Falcon Microtest III de 96 pocillos, y placas Nunc-Immuno (no libres de pirógenos) de 96 pocillos. No obstante, ninguno de los experimentos descritos en Poole et al. incluía el uso de las placas de microtitulación con pocillos que tenían un recubrimiento de polipropileno o placas que estaban hechas enteramente de polipropileno.

4. Los resultados de Poole et al. demostraron que ni la forma ni el recubrimiento o composición de los pocillos de las placas de microtitulación utilizadas en el análisis tuvieron un efecto sobre la capacidad del análisis de detectar pirógenos. Comunicamos este hallazgo declarando (en la página 213, primer párrafo de la sección Resultados de Poole et al.): "Todos los diferentes tipos de placas usados en los análisis con una sola placa, v.g., de 'fondo plano', 'fondo en U', estireno y PVC arrojaron resultados similares."

5. Luego de la publicación de Poole et al., y antes de la fecha de prioridad de la solicitud de patente en cuestión, llevamos a cabo un análisis de detección de pirógenos similar al descrito en Poole et al., pero modificamos el análisis, de manera que se utilizaran placas de microtitulación de polipropileno con pocillos no planos. El uso de las placas de microtitulación de polipropileno con pocillos no planos significó una mejora significativa para la detección indirecta de pirógenos distintos de endotoxina. La mejora

(2)

significativa se evidencia, por ejemplo, por la mayor diferencia en la detección de IL-6 ligada a anticuerpo específico de IL-6 (como se representa por la absorbancia a 450 nm) observada entre los controles positivos y negativos con Extraneal, cuando se utilizaron pocillos no planos de polipropileno en el análisis (Figura 12A de la solicitud), comparados con la diferencia entre los dos controles cuando se emplearon pocillos planos de poliestireno en el análisis (Figura 12B de la solicitud). Dado que ni la forma ni el recubrimiento o composición de los pocillos de las placas de microtitulación usadas en el análisis arrojaron una diferencia en los estudios descritos en Poole et al., no esperábamos que el uso de placas de microtitulación de polipropileno con pocillos de fondo no plano aportaría tal mejora en la capacidad del análisis de detectar pirógenos distintos de endotoxina.

6. Declaro que todas las afirmaciones hechas aquí de mi propio conocimiento son verdaderas y que se considera que todas declaraciones hechas en mi leal saber y entender son verdaderas; y, además, que estas declaraciones se hicieron con el conocimiento de que declaraciones falsas deliberadas y similares se pueden penalizar con multa o prisión, o ambas, bajo la Sección 1001 del Título 18 del Código de los Estados Unidos, y que tales declaraciones falsas deliberadas pueden poner en peligro la validez de la solicitud identificada más arriba o cualquier patente que se expida con base en ella.

Firmado:



Stephen Poole

Fecha: 12 de enero de 2010

ANEXO A

HOJA DE VIDA

NOMBRE: Stephen Poole

CARGO: Director de la Sección de Medicinas Parenterales

TÍTULOS ACADÉMICOS: 1974 Licenciado en Química (BSc) (Graduado con Honores) Farmacología, Londres
1980 Doctorado en Farmacología, Londres

FECHA DE NACIMIENTO: 13 de marzo de 1952

EMPLEOS:

1972-1973	Investigador Adjunto, Departamento de Farmacología, Colegio Real de Cirujanos de Londres
1974-1982	Investigador Científico, Departamento de Farmacología, Instituto de Siquiatría, Londres
1982-2004	Investigador/Investigador Senior/Investigador Principal, Instituto Nacional de Normas Biológicas y Control, División de Endocrinología
2004-2006	Investigador Principal, Instituto Nacional de Normas Biológicas y Control, División de Inmunología/Endocrinología
2006-a la fecha	Director de Sección, Instituto Nacional de Normas Biológicas y Control, Sección Parenterales del Grupo de Bioterapéutica

CARGOS DESEMPEÑADOS Y OTRAS RESPONSABILIDADES:

Miembro de:-

- Grupo HPA R&D
- Grupo Asesor Experto MHRA en Estudios Clínicos (de medicinas y vacunas de "riesgo más alto")
- Grupo EDQM MAT (Prueba de Activación de Monocitos – MAT – para pirógenos)
- Grupo EDQM BET (Prueba de Endotoxinas Bacterianas - *Bacterial Endotoxins Test*)
- Grupo EMA directriz en borrador para pruebas pre-clínicas de liberación de citocinas
- USP/EDQM/Farmacopea Japonesa / OMS Grupo de Estandarización de Endotoxinas

PUBLICACIONES

Unas 200 publicaciones evaluadas por expertos, citadas en PubMed, incluyendo dos en la Revista *NATURE*. Numerosos artículos de reseñas y capítulos de libros y co-autoría de: *Interacciones de Bacterias – Citocinas en la Salud y la Enfermedad* (Portland Press, 1998).

PATENTES

1. Péptidos y su composición farmacéutica en el tratamiento del dolor.
Patente número: US538961 1995-02-14
2. Preparación farmacéutica para el tratamiento de procesos inflamatorios.
Patente número: EP1027894 2000-08-16: US6399572 2002-06-04.
3. Prueba de pirogenicidad para uso con sistemas automáticos de inmunoanálisis.
Patente número: US6696261 2004-02-24.

RESUMEN DEL TRABAJO CIENTÍFICO:

Una trayectoria académica en neurofarmacología, farmacología cardiovascular e inmunofarmacología y biología celular, y responsable por la evaluación de medicinas y vacunas biológicas durante más de 25 años. Ha desarrollado y aplicado análisis novedosos a base de células para medir actividades pro-inflamatorias de medicinas y vacunas y sus contaminantes. Una de estas pruebas, la Prueba de Activación de Monocitos para pirógenos, se presentará en la *Ph Eur* en abril de 2010.

Intereses investigativos en los mecanismos subyacentes a la inflamación, la fiebre y el dolor. Resultados de investigación reflejados en unas 200 publicaciones evaluadas por expertos, citadas en PubMed, incluyendo dos en la Revista *NATURE*, numerosos artículos de reseñas y capítulos de libros y co-autoría del libro: *Interacciones de Bacterias*

– *Citocinas en la Salud y la Enfermedad* (Portland Press).

Responsable por la distribución de una variedad de normas y liberación de lotes europeos de medicinas parenterales.

ANEXO B

Una prueba rápida in vitro con 'una sola placa' para pirógenos

Stephen Poole^{a,*}, Yogesh Mistry^a, Christine Ball^a, Rose E. Gaines Das^a,
Lisa Pieti Opie^b, Garry Tucker^b, Mehul Patel^b

^aNational Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QG, Inglaterra, Reino Unido
^bBaxter Healthcare Corporation, 2545 Central Avenue, Suite FD-1, Boulder, CO 80301-2857, USA

Recibido el 18 de Julio de 2002; recibido en forma revisada el 24 de septiembre de 2002; aceptado el 18 de noviembre de 2002

Extracto

Se describe una prueba rápida de activación de monocitos con 'una sola placa' para detectar pirógenos de endotoxina y distintos de endotoxina en productos medicinales parenterales. La prueba con una sola placa ofrece ventajas útiles sobre las pruebas convencionales con 'dos placas' (placa de cultivo celular + placa ELISA) en términos de su límite de detección, robustez y costo. La prueba con 'una sola placa' es susceptible de aplicarse a una amplia gama de productos porque deja menos tiempo para la interferencia del producto en la prueba. La prueba con 'una sola placa' utiliza anticuerpos (Ab) anti-citocina (interleucina (IL)-6 o factor α de necrosis tumoral (TNF α)), libres de pirógenos, esparcidos y estabilizados sobre placas de 96 pocillos (libres de pirógenos). Monocitos/células monocíticas, estándar o muestra de endotoxina (lipopolisacáridos, LPS) y segundos Ab (etiquetados) (libres de pirógenos) se cultivan juntos (usualmente durante 2-4 horas) en la placa recubierta con Ab y luego se lava la placa y se completa el ELISA. No hay transferencia de una placa a la otra ni incubaciones (adicionales) de citocina (liberada), en primer lugar, esparciendo el Ab y, luego, desarrollando el Ab, puesto que estos pasos ya han tenido lugar durante el cultivo celular inicial. La prueba rápida, con 'una sola placa' se automatiza fácilmente. La lectura preferida es IL-6, que arroja un límite de detección de 0,015 unidades de endotoxina (EU - *endotoxin units*)/ml con célula mononuclear de sangre periférica (PBMNC - *peripheral blood mononuclear cell*), 0,03 EU/ml con sangre entera diluida y 0,05 EU/ml con una línea de células monocíticas (MONO MAC 6).

* 2002 Elsevier Science B.V. Reservados todos los derechos.

Palabras claves: Una sola placa; Prueba in vitro para pirógenos; Prueba de activación de monocitos; Endotoxina; Interleucina-6; Factor α de necrosis tumoral.

Abreviaturas: BET, prueba de endotoxinas bacterianas; ELISA, Inmunoanálisis enzimático; EU, unidades de endotoxina; HRP, peroxidasa de rábano; HSA, albúmina sérica humana; IL, interleucina; IU, unidad internacional; LAL, lisado de amebocitos de limulo; LPS, lipopolisacárido; OPD, 1,2-fenilendiamina diclorhidrato ortofenilendiamina; PBMNC, célula mononuclear de sangre periférica; S.E.M., error estándar de la media; TNF α , factor α de necrosis tumoral; Tween 20, monolaurato de polioxietilen-sorbitán; p/v, peso por volumen.

* Autor para correspondencia. Tel.: +44-1707-654753; Fax: +44-1707-646730.

Dirección de correo electrónico: spoole@nibsc.ac.uk (S. Poole).

1. Introducción

Se requiere que los productos farmacéuticos parenterales estén libres de contaminación pirogénica. Aunque un pirógeno

puede definirse como cualquier sustancia que produce fiebre, los pirógenos de interés para la industria farmacéutica son las endotoxinas bacterianas (lipopolisacáridos, LPS) de bacterias gram-negativas, puesto que son las endotoxinas las que más frecuentemente contaminan los productos medicinales parenterales (Mascoli and Weary, 1979a,b). Actualmente una de las pruebas de la Farmacopea para la detección de contaminación pirogénica se aplica a productos medicinales parenterales. Éstas son la prueba de pirógenos en conejos y la prueba de endotoxinas bacterianas (BET - *bacterial endotoxins test*). Como su nombre lo sugiere, la prueba de pirógenos en conejos detecta la endotoxina y otros pirógenos, e implica mediar el aumento en la temperatura corporal provocada en conejos por la inyección intravenosa de una solución estéril de la sustancia a examinarse. Nuevamente, como su nombre lo insinúa, la prueba de endotoxinas bacterianas (BET) detecta únicamente endotoxina. El principio de la BET es que la endotoxina produce coagulación extracelular de la sangre (hemolinfa) del cangrejo herradura, *Limulus polyphemus*, (Levin and Bang, 1964). Aunque la BET, que se conoce también como la

prueba de lisado de amebocitos de límulo (LAL – *Limulus amoebocyte lysate*), está sustituyendo gradualmente a la prueba de pirógenos en conejos, miles de pruebas de pirógenos en conejos se llevan aún a cabo cada año alrededor del mundo, en casos en los cuales no puede aplicarse la BET. Si bien generalmente confiables, tanto la prueba de pirógenos en conejos como la BET presentan deficiencias. La prueba en conejos es costosa, no cuantitativa y utiliza animales experimentales. La BET arroja falsos negativos con ciertos productos, puede sobreestimar el contenido de pirógenos de otros productos, no detecta pirógenos distintos de endotoxina bacteriana (LPS), tales como exotoxinas gran-positivas, virus y hongos (Dinarelli et al., 1984; Poole et al., 1988; Ray et al., 1960; Taktak et al., 1991; Fennrich et al., 1999) y usa asimismo animales, si bien únicamente como donantes ‘involuntarios’ de sangre.

La base de la prueba de pirógenos en conejos es la estimulación *in vivo* por pirógenos exógenos (usualmente endotoxina) de monocitos de sangre periférica de conejos para producir los pirógenos endógenos, los cuales producen fiebre. Los principales pirógenos endógenos son las citocinas factor α de necrosis tumoral (TNF α), interleucina-1 (IL-1 α e IL-1 β , dos productos génicos separados), IL-6 e IL-8 (Dinarelli et al., 1999). Dadas las deficiencias de la prueba de pirógenos en conejos y la BET, se han propuesto pruebas alternativas *in vitro* para pirógenos, basadas en la activación de monocitos. La base de estas ‘pruebas de activación de monocitos’ o ‘pruebas de monocitos’ es la maravillosa sensibilidad al pirógeno exógeno de monocitos humanos. En tales pruebas, se incuban productos con monocitos de sangre periférica humana o, más usualmente, la fracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMNC – *peripheral blood mononuclear cell*) (que contiene monocitos) y medio acondicionado con células analizado con respecto a citocinas pirogénicas (Duff and Atkins, 1982; Dinarelli et al., 1984; Poole et al., 1988, 1989^{a,b}; Hansen and Christensen, 1990; Taktak et al., 1991; Blecker et al., 1994).

Desafortunadamente, el aislamiento de monocitos/PBMNC de sangre entera es intensivo en trabajo, consume mucho tiempo, es técnicamente sofisticado, requiere reactivos costosos y no garantiza el aislamiento de células en un estado no activado. Esto motivó la evaluación de varias líneas celulares ‘monocíticas’, incluyendo células MONO MAC 6 (Ziegler-Heitbroek et al., 1988) y células THP-1 (Tsuchiya et al., 1980) y varias lecturas de citocinas (Poole, 1989; Poole et al., 1989^{a,b}; Taktak et al., 1991). Taktak et al. (1991) prefirieron una prueba MONO MAC 6/IL-6 y la aplicaron a albúmina sérica humana (HSA – *human serum albumin*) terapéutica, que había producido reacciones adversas en destinatarios humanos, y detectaron contaminación pirogénica en la HSA que no se había detectado en la prueba de pirógenos en conejos o en la prueba LAL. Posteriormente, subclones de las líneas celulares MONO MAC 6 y THP-1 se han utilizado *in vitro* para pirógenos (Eperon and Jungi, 1996; Eperon et al., 1997; Peterbauer et al., 1999, 2000; Nakagawa et al., 2002).

Aunque líneas celulares evitan la necesidad de hacer cultivos primarios de glóbulos blancos, una prueba *in vitro* para pirógenos utilizando una línea celular monocítica tiene un número de desventajas. Estas incluyen: (i) las semanas/meses requeridos para establecer, a partir de una alícuota congelada, un número suficiente de células de suficiente sensibilidad (a pirógeno/endotoxina) para usar en una prueba, (ii) inconsistencias en las sensibilidades de células de números de pasadas diferentes, y diferentes periodos de tiempo invertido congelado, (iii) la necesidad de co-estimular con agentes tales como interferón- γ o vitamina D (Taktak et al., 1991; Eperon and Jungi, 1996; Eperon et al., 1997; Peterbauer et al., 1999, 2000), (iv) verificación de la presencia continuada en la línea celular de los varios elementos de receptor (v.g., CD14 y receptores tipo Toll) necesarios para la transducción de respuestas a endotoxina y otros pirógenos (Means et al., 1999; Ulevitch, 1999; Takeuchi et al., 1999).

Para evitar algunas de las desventajas de sistemas de prueba que requieren el aislamiento de glóbulos blancos o mantenimiento

de líneas celulares monocíticas, puede usarse sangre entera diluida como la fuente de monocitos, puesto que los monocitos en sangre entera diluida responden a pirógeno/endotoxina liberando citocinas pirogénicas (Desch et al., 1989; Finch-Arietta and Cochran, 1991; Nerad et al., 1992; De Groote et al., 1992; Hartung and Wendel, 1996; Shins et al., 1996; Pool et al., 1998; Nakagawa et al., 2002). Una prueba de monocitos, que utiliza sangre entera diluida como la fuente de monocitos, ofrece la ventaja considerable de no requerir el aislamiento de monocitos/glóbulos blancos y de cultivar los monocitos en la presencia de todos los constituyentes de la sangre, con los cuales residen usualmente. Sin embargo, en común con la totalidad de las variantes previas de la prueba *in vitro* para pirógenos (‘prueba de monocitos’), la ‘sangre entera en la prueba *in vitro* para pirógenos’ adolece de la desventaja de requerir dos pasos de incubación, en dos placas separadas: una incubación de monocitos (como sangre diluida) con una sola placa, seguida por una segunda incubación de la sangre diluida acondicionada con monocitos en la placa ELISA, usada para la cuantificación de la citocina medida.

Los objetivos del estudio eran evaluar el valor de la prueba de activación de monocitos *in vitro* con ‘una sola placa’ para pirógenos, con el fin de determinar si ofrecía o no ventajas significativas sobre las pruebas convencionales con ‘dos placas’ (placa de cultivo + ELISA) en términos de su límite de cuantificación, robustez, velocidad y costo.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos

Los siguientes materiales se obtuvieron de las fuentes indicadas. Las normas internacionales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para endotoxina bacteriana (LPS, código de ampolla 94/580, idéntico a EC6 [US FDA], lote G [USP] y BRP3 [EP]), IL-1 β (86/680), IL-6 (89/548), y TNF α (87/650) fueron facilitadas por NIBSC. Las actividades específicas de estas normas son endotoxina: 10.000 IU (unidades internacionales) = 10.000 EU (unidades de endotoxina, FDA/USP) = 1 μ g *E. coli* endotoxina/vial, IL-1 β : 100.000 IU/11 μ g/ampolla, IL-6: 100.000 IU/1 μ g/ampolla, TNF α : 40.000 IU/1 μ g/ampolla. Pares combinados (para ELISA) de anticuerpos monoclonales (MAbs) a IL-1 β humana y a IL-6 humana (R&D Systems). Fragmin (Dalteparina, 10.000 IU/ml, Pharmacia, anticuerpo monoclonal anti-TNF α humano (MAb) 101-4 y suero anti-TNF α en oveja fueron un obsequio del Dr. T. Meager, División de Inmunología, NIBSC.

2.2 Consumibles

Placas de microtitulación, de 96 pocillos, de estireno, con ‘fondo plano’, Dynex PF (#9305 Dynex Tech.); placas de microtitulación, de 96 pocillos, de estireno, con ‘fondo en U’ Dynex PF (#2305); placas de de microtitulación, 96 pocillos, de PVC, con ‘fondo en U’ (no PF) (#2401); placa de cultivo de tejido Falcon Microtest de 96 pocillos (#353072); placas de análisis de 96 pocillos, flexibles, Falcon Microtest III (#3911, Beckton Dickinson Labware: 353072); placas de 96 pocillos (no PF) Nunc-Immuno; tubos centrifugos (Falcon 2070 Blue Max); DEAE Trisacryl M, solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (Sigma, D-703); glicina grado cultivo celular (G-6388); ácido clorhídrico, 0,1 M, filtrado estérilmente (Sigma, H-9892); monalaurato de sorbitán-polioxi-etileno grado cultivo celular (Tween 20, P-2287); sucrosa grado cultivo celular (S-1888); dihidrato de trehalosa grado cultivo celular (T-0167, Sigma Chemical); concentradores de proteína Gyrocent-L (Triple red Lab. Tech., #1433400); viales criogénicos Nalgene (#5000-0020); RPMI-1640 (GIBCO, Life Technologies), preparados estériles y libres de pirógenos; HSA estéril, 4,5% p/v, Blood Products Laboratory, Elstree, Herts); agua estéril, libre de pirógenos para

irrigación y 0,9% p/v NaCl (Baxter Healthcare). Otros reactivos/materiales se adquirieron como estériles y libres de pirógenos y los utensilios de vidrio se pusieron al horno a 250 °C durante 1 hora.

2.3 Preparación de anticuerpos anti-citocina, libres de pirógenos

Anticuerpos policlonales anti-IL-6 se purificaron de un suero anti-IL-6 en cabra por cromatografía de afinidad en IL-6 (Taktak et al., 1991) usando amortiguador de lavado libre de pirógenos y amortiguador de elución. Las fracciones se neutralizaron con 1 M de bicarbonato de sodio libre de pirógenos. Los anticuerpos se concentraron en un concentrador centrífugo Gyrocen-L. Anticuerpos anti-IL-6 biotinilados, libres de pirógenos, se prepararon y purificaron como se describe previamente (Taktak et al., 1991), excepto que se utilizó amortiguador libre de pirógenos. Anticuerpos anti-IL-6 etiquetados con HRP, anticuerpo monoclonal anti-TNF α (MAb) 101-4 (Meager et al., 1987), purificados por FPLC, e IgG anti-TNF α policlonal en oveja (purificado por HPLC o en DEAE Trisacryl M. Sigma) se liberaron de pirógenos usando End-X (Associated of Cape Cod. USA). Las soluciones de anticuerpos libres de pirógenos contenían <0,03 EU (= IU)/ml de contaminación de endotoxina medida en una prueba LAL.

2.4 Preparación y estabilización de placas de 96 pocillos pre(cubiertas) con anticuerpos anti-citocina, libres de pirógenos

Placas no estériles se enjuagaron extensivamente con PBS libre de pirógenos. Placas de noventa y seis pocillos de cada tipo (ver más arriba) se recubrieron con anticuerpos anti-citocina libres de pirógenos: anticuerpos policlonales anti-IL-6 humana en cabra, MAb 101-4 contra TNF α humano (1 μ g/ml, en PBS estéril, pH 7,4, o amortiguador de bicarbonato de sodio, pH 8,2-9,6, 100 μ l/pocillo, + 4 °C, de un día para otro). Las placas se lavaron dos veces con PBS + 0,1% Tween 20, luego una vez con PBS estéril (sin Tween). Si las placas no se requerían inmediatamente, se agregaba una solución de bloqueo/glaseado (100 μ l/pocillo de trehalosa estéril, 2% + HSA estéril, 1% o sucrosa estéril, 5% + HSA estéril, 1%) durante 1 hora a temperatura de la sala. Luego de 1 hora, la solución de bloqueo/glaseado se decantó cuidadosamente y las placas se secaron con aire en un gabinete 'estéril' Clase II durante un mínimo de 4 horas (usualmente de un día para otro), se sellaron en bolsas plásticas y se almacenaron a 4 °C.

2.5 Recolección de sangre

Veinte donantes de sangre se incluyeron en el estudio. Siete eran hombres y trece eran mujeres. Las edades de los hombres variaban de 27 a 47 años con una media de 36 años. Las edades de las mujeres variaban de 23 a 49 años con una media de 34 años. La totalidad de los donantes parecía estar en buena salud. Ninguno estaba tomando AINE, inmunosupresores, glucocorticoides o cualesquiera otros medicamentos conocidos por influir en la producción de citocinas. Usando una jeringa de 20 ml y una aguja calibre 21, se extrajeron 2-10 ml de sangre de la vena cubital media o cefálica del brazo izquierdo o derecho de los donantes y se transfirieron inmediatamente a tubos de centrifuga, libres de pirógenos, estériles, de 50 ml (Falcon 2070 Blue Max), que contenían suficiente heparina (Fragmin, 10.000 IU/ml, Pharmacia, diluida 1/10 con solución salina libre de pirógenos, estéril) para dar una concentración de 10 IU/ml en la sangre. La sangre se recogió en la mañana, se mantuvo a temperatura de la sala y se utilizó en el término de 1 hora (típicamente 30 minutos) de su recolección. La duración del almacenamiento de sangre a corto plazo no afecta significativamente la liberación de IL-6 (Schins et al., 1996).

2.6 Aislamiento de PBMNC y cultivo de PBMNC y células MONO MAC 6 y THP-1

El aislamiento de PBMNC y el cultivo de PBMNC, células MONO MAC 6 y THP-1 fueron como se describe previamente (Taktak et al., 1991). Se hicieron conteos de números de células viables tomando una alícuota de 100 μ l de una suspensión de células y agregando 850 μ l RPMI y 50 μ l 0,4% p/v de solución de azul de tripano. El número de células viables en esta solución se contó usando un hemocitómetro. Este procedimiento se describe en detalle en el Catálogo Sigma (Biochemical and Reagents For Life Science Research) 2000/2001, páginas 1848-1849.

2.7. Protocolo para la prueba in vitro con 'dos placas' para detectar la presencia de pirógenos usando PBMNC, células MONO MAC 6 o THP-1

Cultivos (250 μ l) se llevaron a cabo en cuadruplicado usando placas de 96 pocillos. El volumen de 250 μ l comprendía: muestras/estándares diluidos en RPMI que contenía 2% de suero AB (125 μ l) y células en una concentración inicial de dos millones de células/ml en RPMI que contenía 2% de suero AB (125 μ l), arrojando una concentración final (en los pocillos) de un millón de células/ml. Los contenidos de los pocillos se mezclaron agitando suavemente (sin contaminar los pocillos de manera cruzada) y se incubaron sin vibración (para permitir que las células se sedimentaran) a 37 °C durante 2-24 horas en una atmósfera de 5% CO₂ en aire. Al final de la incubación del cultivo de tejido, el medio de cultivo acondicionado con células encima de las células se homogeneizó aspirando y expulsando 100 μ l tres veces antes de transferir alícuotas de 100 μ l del medio de cada uno de los pocillos de la placa de cultivo de tejido a los pocillos correspondientes de la placa ELISA. Se tomaron alícuotas para las determinaciones ELISA de IL-6 (Taktak et al., 1991, o usando un par combinado de MAbs a IL-6 humana de R&D Systems, arrojando ambos análisis resultados similares). TNF α (Meager et al., 1987), IL-1 β (ELISA desarrollado usando los anticuerpos descritos por Rafferty et al., 1991, o usando un par combinado de MAbs a IL-1 β humana de R&D Systems, o un kit ELISA IL-1 β suministrado gentilmente por DPC Biermann, todos los cuales arrojaron resultados similares). Todos los ELISAs empleados detectaron 62,5 pg/ml de citocina o menos, y mostraron una excelente regresión en la dosis sobre el rango de 62,5-1000 pg/ml, con coeficientes de variación (CVs -*coefficients of variation*) del orden de 7-10%.

2.8. Protocolo para pruebas in vitro con 'dos placas' para pirógenos usando sangre entera humana

Cultivos (250 μ l) de 20% de sangre entera humana se llevaron a cabo en cuadruplicado usando placas de 96 pocillos. Para distribuir células uniformemente en toda la sangre, la donación de sangre se agitó suavemente antes de la extracción de alícuotas (5 ml) en un tubo más pequeño (7 ml) del cual se tomaron alícuotas (50 μ l) para la adición a la placa de cultivo. Las adiciones por pocillo fueron: RPMI (75 μ l), sangre (50 μ l), muestra/estándar de endotoxina en RPMI o solución salina (125 μ l). Los contenidos de los pocillos se mezclaron agitando suavemente (sin contaminar los pocillos de manera cruzada) y se incubaron sin vibración (para permitir que las células se sedimentaran) a 37 °C durante 2-24 horas en una atmósfera de 5% CO₂ en aire. Al final de la incubación del cultivo de tejido, alícuotas de 100 μ l de sobrenadante claro de cada pocillo se transfirieron cuidadosamente a los pocillos correspondientes de la placa ELISA. Se impidió la aspiración de las células apoyando la placa de análisis de manera que se inclinara en un ángulo de alrededor de 45° desde las columnas 1 a 12. Los ELISAs fueron como se describe más arriba en la Sección 2.7.

2.9. Protocolo para la prueba in vitro con 'una sola placa' para pirógenos usando PBMNC, células MONO MAC 6 o THP-1

Cultivos (250 μ l) se llevaron a cabo en cuadruplicado usando placas de 96 pocillos recubiertas previamente con anticuerpos anti-IL-6 libres de pirógenos. El volumen de 250 μ l comprendía: muestras/estándares diluidos en RPMI que contenía 2% de suero AB (125 μ l), anticuerpos anti-IL-6 biotinilados, libres de pirógenos (10 μ l), células en una concentración inicial de dos millones de células/ml en RPMI que contenía 2% de suero AB (115 μ l), arrojando una concentración final (en los pocillos) de un millón de células/ml. Los contenidos de los pocillos se mezclaron agitando suavemente (sin contaminar los pocillos de manera cruzada) y se incubaron sin vibración (para permitir que las células se sedimentaran) a 37 °C durante 2-24 horas en una atmósfera de 5% CO₂ en aire. Al final de la incubación, los cultivos se aspiraron y descartaron (de acuerdo con procedimientos de seguridad locales) y las placas se lavaron cuatro veces con amortiguador de lavado/dilución (Taktak et al., 1991). Los pasos subsiguientes fueron como se describe previamente (Taktak et al., 1991). En pocas palabras, avidina-HRP (en 100 μ l) se agregó durante 15 minutos a temperatura de la sala. OPD (en 100 μ l) se agregó durante 10-20 minutos (hasta que se desarrolló color suficiente). 1 M H₂SO₄ (150 μ l/pocillo) se agregó para detener la reacción. Se leyeron las densidades ópticas a 490 nm. En algunos experimentos, anticuerpos anti-IL-6 etiquetados con HRP se sustituyeron por anticuerpos anti-IL-6 biotinilados para eliminar el paso avidina-HRP y reducir así el número de pasos requeridos para el ELISA. El ELISA para IL-6 detectó 62,5 pg/ml de citocina o menos y mostró una excelente regresión en la dosis sobre el rango de 62,5-4000 pg/ml, con coeficientes de variación (CVs) del orden de 7-10%.

2.10. Protocolo para la prueba in vitro con 'una sola placa' para pirógenos, usando sangre entera humana

Cultivos (250 μ l) de 20% de sangre entera humana se llevaron a cabo en cuadruplicado usando placas de 96 pocillos recubiertas previamente con anticuerpos (IL-6 o TNF α) anti-citocina, libres de pirógenos. Para distribuir células uniformemente en toda la sangre, la donación de sangre se agitó suavemente antes de la extracción de alícuotas (5 ml) en un tubo más pequeño (7 ml) del cual se tomaron alícuotas (50 μ l) para la adición a la placa de cultivo. Las adiciones por pocillo fueron: RPMI o solución salina (65 μ l), sangre (50 μ l), anticuerpos (IL-6 o TNF α) anti-citocina, biotinilados, (10 μ l) y muestra/estándar de endotoxina en RPMI o solución salina (125 μ l). Los contenidos de los pocillos se mezclaron agitando suavemente (sin contaminar los pocillos de manera cruzada) y se incubaron sin vibración (para permitir que las células se sedimentaran) a 37 °C durante 2-24 horas en una atmósfera de 5% CO₂ en aire. Los pasos siguientes a la incubación fueron como se describe más arriba en la Sección 2.9. Los ELISAs para IL-6 y TNF α detectaron 62,5 pg/ml de citocina o menos y mostraron una excelente regresión en la dosis sobre el rango de 62,5-4000 pg/ml, con coeficientes de variación (CVs) del orden de 7-10%.

3. Resultados

La totalidad de los diferentes tipos de placas usados en los análisis con una sola placa, v.g., de 'fondo plano', 'fondo en U', estireno y PVC arrojaron resultados similares. Análogamente, los diferentes amortiguadores de recubrimiento/bloqueo tuvieron resultados similares.

3.1. Comparación de las pruebas con una sola placa y con dos placas para pirógenos usando PBMNC/IL-6

La estimulación de PBMNCs (10⁶ células/ml) con endotoxina

(LPS, 0-0,25 EU/ml = 0-25 pg/ml) durante 4 horas provocó la liberación dependiente de la dosis de IL-6 inmunoreactiva en el medio acondicionado con PBMNC (Fig. 1). Con el formato con una sola placa, la curva de respuesta a la dosis endotoxina — IL-6 fue más pronunciada y el límite de detección (0,015 EU/ml) menor que el formato con dos placas (0,03 EU/ml). El límite de detección se calculó como 3,3 x la desviación estándar de la respuesta dividida por la pendiente de la curva de calibración, como se describe en la ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996 (<http://www.mecclurenet.com/EMEA...PDFs/Q2a.pdf>). La estimulación de células durante 24 horas arrojó resultados similares, excepto que los valores de IL-6 se aumentaron aproximadamente dos veces (datos no mostrados).

3.2. Comparación de las pruebas con una sola placa y con dos placas para pirógenos usando líneas de células monocíticas

La estimulación de células MONO MAC 6 (10⁶ células/ml) con endotoxina (LPS, 0-0,8 EU/ml = 0-80 pg/ml) durante 24 horas provocó la liberación dependiente de la dosis de IL-6 inmunoreactiva en el medio acondicionado con células (Fig. 2).

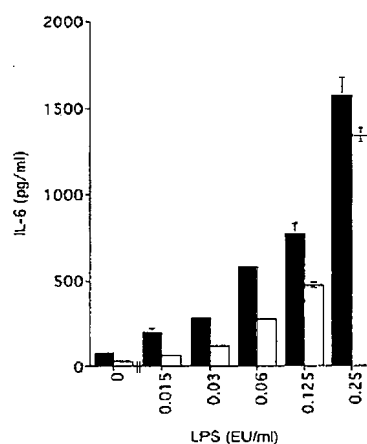


Fig. 1. Comparación de pruebas in vitro con 'una sola placa' (columnas rellenas) y con 'dos placas' (columnas sin rellenas) para pirógenos usando PBMNCs (10⁶ células/ml) estimuladas con endotoxina (LPS, 0-0,25 EU/ml = 0-25 pg/ml) durante 4 horas. Los valores para IL-6 son medias de cuadruplicados $\pm$ S.E.M. El experimento es representativo de tres experimentos independientes, usando cada uno PBMNCs de un donante diferente.

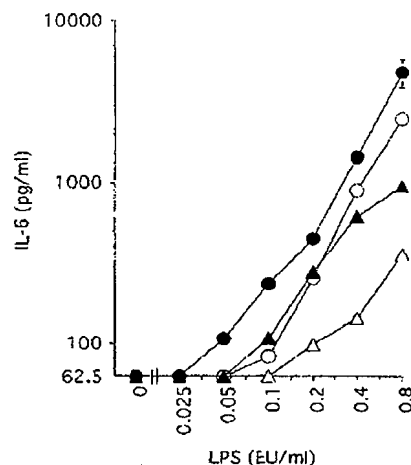


Fig. 2. Comparación de las pruebas in vitro con 'una sola placa' y con 'dos placas' para pirógenos usando células MONO MAC 6 y células THP-1. La liberación de IL-6 por células MONO MAC 6 (círculos) y células THP-1 (triángulos) estimuladas con

endotoxina (LPS, 0-0,8 EU/ml = 0-80 pg/ml) usando el formato con 'una sola placa' (símbolos rellenos) o el formato con 'dos placas' (símbolos sin rellenar). Los valores para IL-6 son medias de cuadruplicados $\pm$ S.E.M. El experimento es representativo de tres experimentos independientes, usando cada uno células de un número diferente de pasadas.

Con el formato con una sola placa, la curva de respuesta a la dosis de endotoxina—IL-6 fue más pronunciada y el límite de detección (0,05 EU/ml) menor que con el formato con dos placas (0,1 EU/ml). Resultados similares se obtuvieron con células THP-1: estimulación de células THP-1 (10^6 células/ml) con endotoxina (LPS, 0-0,8 EU/ml = 0-80 pg/ml) durante 24 horas provocó la liberación dependiente de la dosis de IL-6 inmunorreactiva en el medio acondicionado con células (Fig. 2). Nuevamente, con el formato con una sola placa, la curva de respuesta a la dosis de endotoxina-IL-6 fue más pronunciada y el límite de detección (0,1 EU/ml) menor que con el formato con dos placas (0,2 EU/ml).

3.3. Liberación de TNF α , IL-1 β e IL-6 por sangre entera (20%) estimulada con endotoxina en una prueba con dos placas

La estimulación de sangre entera (diluida 1/5 a 20% con solución salina) con endotoxina (LPS, 0-4 EU/ml =0-400 pg/ml) durante 4 horas provocó la liberación de TNF α inmunorreactivo, IL-1 β , e IL-6 en la sangre (Fig. 3).

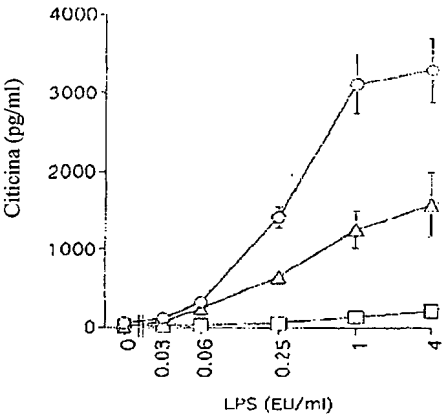


Fig. 3. Liberación de citocinas por sangre entera estimulada con endotoxina (LPS) en una prueba con una sola placa. La liberación de IL-1 β (cuadrados), TNF α (triángulos), e IL-6 (círculos) por sangre entera (diluida 1/5 a 20% con RPMI) estimulada con endotoxina (LPS, 0-4 EU/ml = 0-400 pg/ml) durante 4 horas. Los valores para citocinas son medias $\pm$ S.E.M.s de seis experimentos independientes, usando cada uno sangre de un donante diferente.

Las respuestas para cada citocina fueron dependientes de la dosis y las concentraciones relativas de las citocinas (pg/ ml) liberadas para una dosis dada de endotoxina tuvieron la relación IL-6>TNF α >IL-1 β . Un patrón similar de liberación de citocinas se obtuvo con una estimulación durante 24 horas con endotoxina (datos no mostrados).

3.4. Comparación de pruebas de sangre entera con una sola placa y con dos placas para pirógenos con IL-6 como la lectura

La estimulación de sangre entera humana (diluida 1/5 a 20% con solución salina) con endotoxina (LPS, 0-4 EU/ ml = 0-400 pg/ml) durante 4 horas provocó la liberación dependiente de la dosis de IL-6 inmunorreactiva en la sangre (Fig. 4). Con el formato con una sola placa, las curvas de respuesta a la dosis de endotoxina—IL-6 fueron más pronunciadas y el límite de detección (0,03 EU/ml) menor que con el formato con dos placas (0,06 EU/ml).

3.5. Comparación de pruebas de sangre entera con una sola placa y con dos placas para pirógenos con TNF α como la lectura

La estimulación de sangre entera humana (diluida 1/5 a 20% con solución salina) con endotoxina (LPS, 0-4 EU/ ml = 0-400 pg/ml) durante 2 horas provocó la liberación dependiente de la dosis

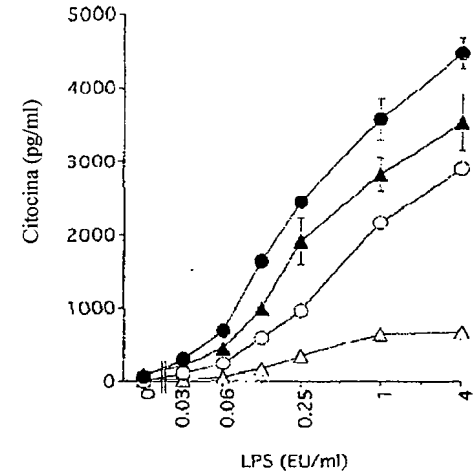


Fig. 4. Comparación de pruebas de sangre entera con 'una sola placa' y con 'dos placas' para pirógenos con IL-6 y TNF α como las lecturas. La liberación de IL-6 (círculos) y TNF α (triángulos) por sangre entera (diluida 1/5 a 20% con solución salina) estimulada con endotoxina (LPS, 0-4 EU/ml =0-400 pg/ml) durante 2 horas (TNF α) o 4 horas (IL-6) usando el formato con 'una sola placa' (símbolos rellenos) o el formato con 'dos placas' (símbolos sin rellenar). Los valores para TNF α e IL-6 son medias de cuadruplicados $\pm$ S.E.M. El experimento es representativo de tres experimentos independientes, cada uno usando sangre de un donante diferente.

de TNF α inmunorreactivo (Fig. 4). Con el formato con una sola placa, la curva de respuesta a la dosis de endotoxina—TNF α fue más pronunciada y el límite de detección (0,03 EU/ml) menor que con el formato con dos placas (0,06 EU/ml).

3.6. Recuperaciones máximas (spike recoveries) para HAS enriquecida con endotoxina

Recuperaciones máximas (%) para LPS (2,5 EU/ml) agregados a HSA (4,5%) y diluida 1/10 para pruebas con sangre entera (20%, cultivo de 4 horas) se dan en la Tabla 1. En las pruebas de

Tabla 1 Recuperaciones máximas (%) para LPS agregados a HSA (4,5%) y diluidos 1/10 para pruebas con sangre entera (20%, cultivo de 4-horas)			
Tipo de Prueba	Lectura	LPS máximos (EU/ml)	Recuperación máxima %
Dos placas	TNF α	2,5	73 $\pm$ 6 (n = 11)
Dos placas	IL-1 β	2,5	49 $\pm$ 13 (n = 6)
Dos placas	IL-6	2,5	64 $\pm$ 8 (n = 13)
Una placa	IL-6	2,5	87 $\pm$ 13 (n = 8)

Valores son medias $\pm$ S.E.M.

dos placas con TNF α como lectura. La recuperación máxima de LPS fue de 73 $\pm$ 6%, comparada con 64 $\pm$ 8% con IL-6 como la lectura y apenas 49 $\pm$ 13% con IL-1 β como la lectura. En las pruebas con una sola placa con IL-6 como lectura, la recuperación máxima aumentó notoriamente a 87 $\pm$ 13%.

4. Discusión

En los 20 años transcurridos desde que se sugirió por primera vez una prueba *in vitro* para pirógenos ('prueba de monocitos') (Duff and Atkins, 1982), se han descrito varios sistemas de prueba diferentes. Las fuentes de monocitos/células monocíticas

han incluido monocitos purificados, PBMNC, líneas de células monocíticas y sangre entera diluida, y las lecturas seleccionadas han incluido TNF α , IL-1 β , IL-6, and neopterina (reseñado por Poole and Gaines Das, 2001). Con monocitos, PBMNC y células monocíticas, la lectura preferida es usualmente IL-6, porque IL-6, a diferencia de IL-1 β y TNF α , es secretada enteramente en el medio acondicionado con células en grandes cantidades, permitiendo en esa forma su cálculo completo (Poole et al., 1989a,b; Taktak et al., 1991). En contraste con IL-6, TNF α inmunorreactivo e IL-1 β permanecen en gran medida intracelulares, planteando la posibilidad de que preparaciones de prueba, que afectan la permeabilidad de las células, podrían ser más propensas a interferir en las pruebas con TNF α (inmunorreactivo) o IL-1 β como la lectura, y no con IL-6. Asimismo, ciertos componentes bacterianos pro-inflamatorios estimulan la producción de IL-6, pero no TNF α e IL-1 β (Reddi et al., 1996).

En un reciente estudio usando sangre entera (Nakagawa et al., 2002), se informó que los pirógenos estructuralmente diversos endotoxina, peptidoglicano, *Staphylococcus aureus* Cowan 1 y poly(I.C) estimulaban todos la liberación de más IL-6 que cualquiera de los dos TNF α o IL-1 β (valores dados en pg/ml). Más aún, IL-6 fue inducida por concentraciones más bajas de cada pirógeno de lo que se requería para inducir TNF α e IL-1 β . Consistentes con estos datos, las concentraciones de IL-6 detectadas en sangre periférica luego de la administración de endotoxina en el hombre fueron mayores que las concentraciones de TNF α e IL-1 β (Luheshi and Rothwell, 1996; Bruunsgaard et al., 1999; Suffredini et al., 1999). Por supuesto, existe evidencia sólida para sugerir que IL-6 es el principal pirógeno endógeno en circulación en el hombre (Dinarello, 1999) y animales experimentales (Dinarello et al., 1999; Cartmell et al., 2000) y que se correlaciona mejor con la actividad pirogénica en la sangre (Rothwell, 1990; Kluger, 1991; Buck et al., 1994; Rothwell and Hopkins, 1995; Lin and Huang, 1998; Otto et al., 1999; Dinarello, 1999). La actividad pirogénica de TNF α e IL-1 parece depender en gran medida de IL-6 (Chai et al., 1996; Luheshi and Rothwell 1996; Sundgren-Andersson et al., 1998; Zetterstrom et al., 1998; Cartmell et al., 2000).

Con IL-6 como la lectura, el formato con una sola placa ofrecía un menor límite de detección que los análisis convencionales de dos placas. Con PBMNC, el límite de detección fue de 0,015 EU/ml incluso si la duración del cultivo celular era de apenas 4 horas, y límites de detección de 0,05 y 0,1 EU/ml se obtuvieron con las líneas de células monocíticas MONO MAC 6 y THP-1, respectivamente, con cultivos celulares de 24 horas de duración. Las ventajas de estos límites menores de detección es que permiten diluciones más grandes de las muestras de prueba para superar la interferencia por las muestras en la prueba.

El uso de sangre entera humana (diluida) como una fuente de monocitos se ha descrito por un sinnúmero de grupos, incluyendo Desch et al., 1989; Finch-Arietta and Cochran, 1991; Nerad et al., 1992; De Groote et al., 1992; Hartung and Wendel, 1996; Schins et al., 1996; Pool et al., 1998; Fennrich et al., 1999; Jahnke et al., 2000; Nakagawa et al., 2002. Las principales diferencias entre los diferentes protocolos que utilizan sangre entera son la citocina elegida como la lectura (variable medida), la duración del cultivo de sangre, y la inclusión/omisión de interferón- γ como co-estimulo (agente de inducción). La lectura preferida es IL-1 β (Harrung and Wendel 1996; Fennrich et al., 1999; Jahnke et al., 2000) o IL-6 (Pool et al., 1998; Nakagawa et al., 2002), aunque parecería que TNF α es también apropiado (Desch et al., 1989; Finch-Arietta and Cochran, 1991; De Groote et al., 1992; Hartung and Wendel, 1996). La duración de incubación se determina en cierta medida por la conveniencia pero también por la elección de la lectura. Una corta incubación (4 horas) de sangre (diluida) con una dosis muy grande de endotoxina (10 μ g/ml) estimuló la producción de IL-1 β (y TNF α), mientras que se

requirió una incubación más larga (24 horas) de sangre (diluida) para dosis mucho más pequeñas de endotoxina (1 pg/ml y más) para estimular la producción de IL-1 β (y TNF α , Hartung and Wendel, 1996). Una incubación prolongada (18 horas), en la presencia de interferón- γ , fue igualmente preferida cuando IL-6 fue la lectura (Pool et al., 1998).

En el presente estudio, las concentraciones de citocinas (pg/ml) producidas por sangre entera (diluida) estimulada con endotoxina durante 4-24 horas tuvo el orden de intervalo IL-6>TNF α >IL-1 β , consistente con el reciente estudio de Nakagawa et al., (2002). Igualmente consistente con los datos del grupo japonés fue el hallazgo de que IL-6 fue inducida por concentraciones menores de LPS que las que se requirieron para inducir TNF α y IL-1 β . Para garantizar que los valores para IL-1 β no se estuvieran subestimando, se realizaron mediciones usando tres sistemas ELISA independientes, todos los cuales arrojaron resultados similares. Con respecto a la recuperación de un máximo de endotoxina de 2,5 EU/ml en HSA (4,5% p/v), las mejores recuperaciones máximas de endotoxina en análisis con dos placas usando sangre entera (20%, 4 horas) se obtuvieron con TNF α como lectura, seguido por IL-6 e IL-1 β . En pruebas de sangre entera de 4 horas con IL-6 como lectura, el formato con una sola placa deparó una mejora útil en la recuperación máxima de endotoxina (de 64% a 87%) para el máximo de endotoxina de 2,5 EU/ml en HSA.

La prueba de pirógenos en conejos puede completarse en menos de 4 horas, mientras que la prueba *in vitro* con 'dos placas' para pirógenos implica una incubación de 4 horas de monocitos/células monocíticas y producto, seguida por un ELISA que requiere una segunda incubación de citocina en el anticuerpo de captura. Puesto que la prueba *in vitro* para pirógenos pretende ser un reemplazo de la prueba de pirógenos en conejos, buscamos desarrollar una versión de esta prueba, la prueba con 'una sola placa', que podía completarse en aproximadamente el tiempo tomado para llevar a cabo una prueba de pirógenos en conejos. La prueba con una sola placa utiliza anticuerpos (Ab) anti-citocina (IL-6 o TNF α), libres de pirógenos, recubiertos y estabilizados sobre placas de 96 pocillos (libres de pirógenos). Sangre diluida, estándar/muestra de endotoxina y Ab biotinilados (libres de pirógenos) se cultivan juntos (usualmente durante 2-4 horas, dependiendo de la lectura) en la placa recubierta con Ab y luego la placa se lava y se completa el ELISA. No hay transferencia de una placa a la otra y no más incubaciones (adicionales) de citocina (liberada), en primer lugar, recubriendo Ab y, a continuación, desarrollando Ab, puesto que estos pasos ya han tenido lugar durante el cultivo inicial. La prueba *in vitro* con una sola placa para pirógenos con sangre entera como la fuente de monocitos e IL-6 como la lectura puede llevarse a cabo en 5 horas a partir del momento en que la sangre se extrae y, con TNF α como la lectura, en apenas 3 horas. Con IL-6 como la lectura, hay un cultivo de 4 horas de sangre + producto, y con TNF α esto puede reducirse a 2 horas.

Además de la robustez mejorada (recuperación máxima de endotoxina), el formato con una sola placa ofreció además mejoras en el límite de detección con sangre entera como la fuente de monocitos. Con combinaciones de sangre entera/IL-6/4 horas y sangre entera/TNF/2 horas, el límite de detección fue de 0,03 EU/ml. Con IL-6 como la lectura, es probable que el límite mejorado de detección del formato con una sola placa sea una consecuencia de la extracción/neutralización de IL-6 (a medida que se produce) por los Ab de captura y el Ab segundo. En monocitos, TNF α estimulado por endotoxina e IL-1 β estimulan la producción de IL-6, la cual inhibe además la producción de TNF α e IL-1 β (Schindler et al., 1990). Por consiguiente, la extracción/neutralización de la IL-6 elimina la retroalimentación negativa ejercida por la IL-6 liberada, lo cual lleva a la producción de más TNF α e IL-1 β , que estimulan la producción de más IL-6. Con TNF α como la lectura, la mejora puede ser una

consecuencia de la captura por el anticuerpo anti-TNF α (recubrimiento) (sobre la placa) de monocitos que expresan la forma transmembrana de TNF α (Grell et al., 1995), permitiendo la medición de TNF α tanto el asociado con las células como el liberado.

TNF α tiene una ventaja como la lectura en una prueba con una sola placa para pirógenos debido al tiempo de incubación más corto requerido para su liberación (2 vs. 4 horas para IL-6). Esto hace la lectura de TNF particularmente apropiada para pruebas de pirógenos 'en proceso'. No obstante, la elección de IL-6 como la lectura, además de las ventajas anotadas más arriba, tiene la ventaja, con sangre entera como la fuente de monocitos, de 'descartar' donantes que no estén en buenas condiciones de salud, los cuales pueden presentar respuestas aberrantes. Los cultivos de sangre en la ausencia de endotoxina agregada contenían concentraciones de TNF α inmunorreactivo e IL-1 β cercanas a, o por debajo de, los límites de detección de los ELISAs usados para detectarlos. En contraste, concentraciones de IL-6 inmunorreactiva fueron detectables en estos cultivos. Para donantes sanos, concentraciones de IL-6 inmunorreactiva estuvieron por debajo de 200 pg (20 IU)/ml (típicamente 50 pg/ml o menos), pero en donantes, que se habían recuperado recientemente de infecciones virales o bacterianas menores, concentraciones basales (es decir, no estimuladas) de IL-6 en ocasiones excedieron 200 pg/ml, y respuestas a endotoxina agregada fueron generalmente menores para una dosis dada de endotoxina que para la sangre de donantes sanos (Poole, datos sin publicar). Estos hallazgos están de acuerdo con informes de que concentraciones de IL-6 inmunorreactiva (a diferencia de las de TNF α y IL-1 β), son susceptibles de incrementarse en individuos que no están en buenas condiciones de salud (Buck et al., 1994; Lin and Huang, 1998; Otto et al., 1999). En consecuencia, la elección de IL-6 como la variable medida para una prueba que utiliza sangre entera como la fuente de monocitos permite identificar y 'descartar' (si bien, retrospectivamente) donantes que no se encuentran en buenas condiciones de salud, incluso si se puedan sentir suficientemente bien para servir como donantes de sangre para la prueba. Basados en los datos recolectados para este estudio, un valor de 'corte' de 200 pg (20 IU)/ml para liberación de IL-6 inmunorreactiva basal (no estimulada) se propone para el rechazo de los datos de prueba.

El formato con una sola placa facilitará tanto la aceptación como la automatización de las pruebas *in vitro* para pirógenos. Aunque los pirógenos que contaminan productos medicinales parenterales son casi invariablemente endotoxinas, las cuales estimulan rápidamente la producción de citocinas, algunos pirógenos 'distintos de endotoxina' pueden tomar más tiempo para estimular la producción de citocinas (Fennrich et al., 1999; Hartung et al., 2001). Aunque es poco probable que estos pirógenos distintos de endotoxina sean contaminantes de productos medicinales parenterales, puede requerirse un cultivo de duración más prolongada de 4 horas para garantizar la libertad de contaminación con pirógenos 'distintos de endotoxina'. No obstante, incluso para pruebas que requieren un cultivo >4 horas, muchas de las ventajas (robustez, límite mejorado de detección, conveniencia, costo) del formato con una sola placa todavía se aplicará. El siguiente reto para los científicos que trabajan en esta área es encontrar una alternativa a los análisis que requieren sangre humana, que tienen la desventaja de requerir empleados de laboratorio para recolectar y trabajar con un material que puede contener agentes infecciosos, y a líneas de células que, a partir de una alícuota congelada, pueden requerir semanas/meses para ser apropiadas para uso en una prueba.

Reconocimientos

Los autores están en deuda con la señora Lynn Weller (División de Hematología, NIBSC) por la toma de muestras de sangre y al Dr. Tony Meager (División de Inmunobiología, NTBSC) por

suministrar los anticuerpos anti-TNF α .

Referencias

- Bleeker, W.K., de Groot, E.M., den Boer, P.J., Biessels, P.T., Aarden, L.A., Bakker, J.C., 1999. Measurement of interleukin-6 production by monocytes for *in vitro* safety testing of hemoglobin solutions. *Artif. Cells, Blood Substitutes, Immobilization Biotechnol.* 22, 835.
- Brunsgaard, H., Pedersen, A.N., Schroll, M., Skinhoj, P., Pedersen, B.K., 1999. Impaired production of proinflammatory cytokines in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation in elderly humans. *Clin. Exp. Immunol.* 118, 235.
- Buck, C., Bundschu, J., Gallati, H., Bartmann, P., Pohlandt, F., 1994. Interleukin-6: a sensitive parameter for the early diagnosis of neonatal bacterial infection. *Pediatrics* 93, 54.
- Cartmell, T., Poole, S., Turnbull, A.V., Rothwell, N.J., Luheshi, G.N., 2000. Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J. Physiol.* 526, 653.
- Chai, Z., Gatti, S., Toniatti, C., Poli, V., Bartfai, T., 1996. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183, 311.
- De Groote, D., Zangerle, P.F., Gevaert, Y., Fassotte, M.F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, F., Pirenne, J., Gathy, R., Lopez, M., Dehart, I., 1992. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood: I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 4, 239.
- Desch, C.E., Kovach, N.L., Present, W., Broyles, C., Harlan, J.M., 1989. Production of human tumor necrosis factor from whole blood *ex vivo*. *Lymphokine Res.* 8, 141.
- Dinarello, C.A., 1999. Cytokines as endogenous pyrogens. *J. Infect. Dis.* 179 (Suppl. 2), S294.
- Dinarello, C.A., O'Connor, J.V., LoPreste, G., Swift, R.L., 1984. Human leukocyte pyrogen test for detection of pyrogenic material in growth hormone produced by recombinant *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 20, 323.
- Dinarello, C.A., Gatti, S., Bartfai, T., 1999. Fever: links with an ancient receptor. *Curr. Biol.* 9, R147.
- Duff, G.W., Atkins, E., 1982. The detection of endotoxin by *in vitro* production of endogenous pyrogen: comparison with amoebocyte lysate gelation. *J. Immunol. Methods* 52, 323.
- Eperon, S., Jungi, T.W., 1996. The use of human monocytoïd lines as indicators of endotoxin. *J. Immunol. Methods* 194, 121.
- Eperon, S., De Groote, D., Werner-Felmayer, G., Jungi, T.W., 1997. Human monocytoïd cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and *Limulus* amoebocyte lysate assay. *J. Immunol. Methods* 207, 135.
- Fennrich, S., Fischer, M., Hartung, T., Lexa, P., Montag-Lessing, T., Sonntag, H.G., Weigandt, M., Wendel, A., 1999. Detection of endotoxins and other pyrogens using human whole blood. *Dev. Biol. Stand.* 101, 131.
- Finch-Arietta, M.B., Cochran, F.R., 1991. Cytokine production in whole blood *ex vivo*. *Agents Actions* 34, 49.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793.
- Hansen, E.W., Christensen, J.D., 1990. Comparison of cultured human mononuclear cells, *Limulus* amoebocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens. *J. Clin. Pharm. Ther.* 15, 425.
- Hartung, T., Wendel, A., 1996. Detection of pyrogens using

- human whole blood. *In Vitro Toxicol.* 9, 353.
- Hartung, T., Aaberge, I., Berthold, S., Carlin, G., Charton, E., Coecke, S., Fennrich, S., Fischer, M., Gommer, M., Halder, M., Haslov, K., Jahnke, M., Montag-Lessing, T., Poole, S., Schechtman, L., Wendel, A., Werner-Felmayer, G., 2001. Novel pyrogen tests based on the human fever reaction: the report and recommendations of ECVAM workshop 43. *Altern. Lab. Anim.* 29, 99.
- Jahnke, M., Weigand, M., Sonntag, H.-G., 2000. Comparative testing for pyrogens in parenteral drugs using the human whole blood pyrogen test, the rabbit *in vivo* pyrogen test and the LAL test. *Eur. J. Parenter. Sci.* 5, 39.
- Kluger, M.J., 1991. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* 71, 93.
- Levin, J., Bang, F.B., 1964. A description of cellular coagulation in the Limulus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 155, 337.
- Lin, S.J., Huang, J.L., 1998. Circulating interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and tumor necrosis factor-alpha in children with febrile infection—a comparison with C-reactive protein. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 16, 105.
- Luheshi, G., Rothwell, N., 1996. Cytokines and fever. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 109, 301.
- Mascoli, C.C., Weary, M.E., 1979a. Limulus amebocyte lysate (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectable products and medical devices: advantages to manufacturers and regulatory officials. *J. Parenter. Drug Assoc.* 33, 81.
- Mascoli, C.C., Weary, M.E., 1979b. Applications and advantages of the Limulus amebocyte lysate (LAL) pyrogen test for parenteral injectable products. *Prog. Clin. Biol. Res.* 29, 387.
- Meager, A., Parti, S., Leung, H., Peil, E., Mahon, B., 1987. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of recombinant human tumour necrosis factor (rTNF). *Hybridoma* 6, 305.
- Means, T.K., Lion, E., Yoshimura, A., Wang, S., Golenbock, D.T., Fenton, M.J., 1999. The CD14 ligands lipopolysaccharide and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol.* 163, 6748.
- Nakagawa, Y., Maeda, H., Murai, T., 2002. Evaluation of the *in vitro* pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 588.
- Nerad, J.L., Griffiths, J.K., Van der Meer, J.W., Endres, S., Poutsika, D.D., Keusch, G.T., Bennish, M., Salam, M.A., Dinarello, C.A., Cannon, J.G., 1992. Interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-1 receptor antagonist, and TNF alpha production in whole blood. *J. Leukocyte Biol.* 52, 687.
- Otto, G., Braconier, J., Andreasson, A., Svanborg, C., 1999. Interleukin-6 and disease severity in patients with bacteremic and nonbacteremic febrile urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* 179, 172.
- Peterbauer, A., Werner, E.R., Werner-Felmayer, W., 1999. Neopterin and nitrite in supernatants from interferon- γ -treated monocytoic cell lines: a tool to identify bacterial pyrogens. *Pteridines* 10, 112.
- Peterbauer, A., Eperon, S., Jungi, T.W., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., 2000. Interferon-gamma-primed monocytoic cell lines: optimizing their use for *in vitro* detection of bacterial pyrogens. *J. Immunol. Methods* 233, 67.
- Pool, E.J., Johaar, G., James, S., Petersen, I., Bouic, P., 1998. The detection of pyrogens in blood products using an *ex vivo* whole blood culture assay. *J. Immunoassay* 19, 95.
- Poole, S., 1989. 'Monocyte test' for pyrogen. *Pharmeuropa I* (5), 238.
- Poole, S., Gaines Das, R.E., 2001. Towards a 'human pyrogen test'. *J. Parenter. Sci.* 6 (2), 63.
- Poole, S., Thorpe, R., Meager, A., Hubbard, A.R., Gearing, A.J.H., 1988. Detection of pyrogen by cytokine release. *Lancet* 8577, 130.
- Poole, S., Bristow, A.F., Selkirk, S., Rafferty, B., 1989a. Development and application of radioimmunoassays for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta. *J. Immunol. Methods* 116, 259.
- Poole, S., Selkirk, S., Rafferty, B., Meager, A., Thorpe, R., Gearing, A., 1989b. Assay of pyrogenic contamination in pharmaceuticals by cytokine release. *Proceedings of the European Workshop on detection and quantification of pyrogen. Pharmeuropa I (Special issue)* 17.
- Rafferty, B., Mower, J.A., Taktak, Y.S., Poole, S., 1991. Measurement of cytokine production by the monocytic cell line Mono Mac 6 using novel immunoradiometric assays for interleukin-1 beta and interleukin-6. *J. Immunol. Methods* 144, 69.
- Ray, A., Redhead, K., Selkirk, S., Poole, S., 1990. Variability in LPS composition, antigenicity and reactogenicity of phase variants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 79, 211.
- Reddi, K., Nair, S.P., White, P.A., Hodges, S., Tabona, P., Meghji, S., Poole, S., Wilson, M., Henderson, B., 1996. Surface-associated material from the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* contains a peptide which, in contrast to lipopolysaccharide, directly stimulates fibroblast interleukin-6 gene transcription. *Eur. J. Biochem.* 236, 871.
- Rothwell, N.J., 1990. Mechanisms of the pyrogenic actions of cytokines. *Eur. Cytokine Network* 1, 211.
- Rothwell, N.J., Hopkins, S.J., 1995. Cytokines and the nervous system: II. Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 18, 130.
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S.C., Dinarello, C.A., 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), and tumour necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75, 40.
- Schins, R.P.F., van Hartingsveldt, B., Borm, P.J.A., 1996. *Ex vivo* cytokine release from whole blood. *Exp. Toxicol. Pathol.* 48, 494.
- Suffredini, A.E., Hochstein, H.D., McMahon, E.G., 1999. Dose-related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a new clinical lot of *Escherichia coli* O: 113 endotoxin. *J. Infect. Dis.* 179, 1278.
- Sundgren-Andersson, A.K., Ostlund, P., Bartfai, T., 1998. IL-6 is essential in TNF-alpha-induced fever. *Am. J. Physiol.* 275 (6 Pt 2), R2028.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components, immunity II, 443.
- Taktak, Y.S., Selkirk, S., Bristow, A.F., Carpenter, A., Ball, C., Rafferty, B., Poole, S., 1991. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 578.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., 1980. Establishment and characterisation of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 147.
- Ulevitch, R.J., 1999. Toll gates for pathogen selection. *Nature* 401 (6755), 755.
- Zetterstrom, M., Sundgren-Andersson, A.K., Ostlund, P., Bartfai, T., 1998. Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 856, 48.
- Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmuller, G., 1988. Establishment of a human cell line (MONO MAC 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* 41, 465.

EDTNA/ERCA Guidelines: Technical Section

1 Quality assurance for dialysis-quality water and dialysis fluid

1.1 Guidelines for the control and monitoring of microbiological contamination in water for dialysis

1.1.1 Scope

These guidelines apply to the control and monitoring of microbiological contamination in:

- water used for preparation of dialysis fluid in all settings, including patients' homes and acute care units
- water used for in-house production of liquid concentrates
- water used for reprocessing dialysers
- water used for preparation of ultrapure dialysis fluid by equipment fitted with additional point-of-use filtration

These guidelines should be taken into consideration when designing and modifying water treatment and distribution systems. Microbiological quality is affected by all components of the water treatment system, from the pre-treatment devices to the point of use. The suppliers of all components should ensure that their products are compatible with these guidelines. Where the complete installation is assembled using components from different suppliers, the renal unit staff must take overall responsibility for implementing the guidelines.

The microbiological quality of the water over the life of the system will depend on the maintenance. Responsibility for the specification and validation of the disinfection method and frequency may lie with a supplier or with the renal unit staff. This must be established before the system is put into use.

Although day-to-day management of the quality of the water used for dialysis is normally delegated to technical staff, ultimate responsibility for water quality may lie with the physician or pharmacist in charge of the dialysis service, or with a designated team, according to national regulations. To reflect this multidisciplinary process, these guidelines have been reviewed and approved by the European Society for Artificial Organs (ESAO) and by the European Renal Association/European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA).

1.1.2 Exclusions

These guidelines are not applicable to water used in the preparation of commercially available dialysis fluid or substitution fluid supplied in sterile bags.

1.1.3 Applicable standards and guidelines

Monograph 1167:1997 (corrected 2000, republished 2001) Haemodialysis solutions, concentrated, water for diluting. *European Pharmacopoeia* Supplement 2001.

Monograph 0128:2000: Haemodialysis, solutions for. *European Pharmacopoeia*, Supplement 2001.

Circulaire DGS/DH/AFSSAPS No 311 relative aux spécifications techniques et à la sécurité sanitaire de la pratique de l'hémodiafiltration et de l'hémodiafiltration en ligne dans les établissements de santé. [Technical specifications and medical security of on-line haemofiltration and haemodiafiltration used in health care institutions] 7 June 2000 (*French*).

Tillverkning och hantering av hemodialysvätskor och hemofiltrationsvätskor inom sjukvården. [Manufacturing and handling of fluids for haemodialysis and haemofiltration in medical care] *Svensk läkemedelsstandard (SLS) 2001* (*Swedish*).

ERA-EDTA European Best Practice Guidelines for Haemodialysis: IV. Dialysis fluid purity. *Nephrology, Dialysis and Transplantation* 2002, Supplement (in press).

1.1.4 Glossary

For the purpose of these guidelines, the following definitions apply:

Biofilm: A coating on surfaces consisting of microcolonies of bacteria embedded in a protective extracellular matrix. The matrix, a slimy material secreted by the cells, protects the bacteria from antibiotics and disinfectants.

Colony forming units (CFU): An organism capable of replicating to form a distinct, visible colony on a culture plate. In practice, a colony may be formed by a group of organisms.

Dialysis fluid concentrate: A solution of chemicals which, when appropriately diluted, produces the dialysis fluid (definition from IEC 60601-2-16 2.107). Concentrates may be purchased as ready solutions or as powder that must be dissolved before use. They are subject to the requirements of EP Monograph 0128:2000.

Dialysis fluid: A solution that is intended to exchange solutes and/or water with blood during haemodialysis or

haemodiafiltration (definition from IEC 60601-2-16 2.107). 'Dialysate' is commonly used in place of dialysis fluid, although this term should be reserved for contaminated fluid leaving the dialyser.

Disinfection: The destruction of micro-organisms by physical (e.g. heat or UV radiation) or chemical means. Disinfection is a less lethal process than sterilization, since it is expected to destroy most recognized pathogenic micro-organisms, but not necessarily all those present. Disinfection does not eliminate endotoxin or other bacterial 'by-products', such as exotoxins.

Distribution system: The pipework used to transport treated water to the dialysis machine, together with any associated tanks, pumps, filters, irradiation units etc. The connections to the dialysis machines also form a part of the distribution system.

Endotoxin: A group of pyrogenic substances (lipopolysaccharides) that form a structural part of the outer cell wall of gram-negative bacteria. Under stress or during proliferation, endotoxin can be released from the bacteria. Endotoxins belong to the group of cytokine inducing substances and can cause fever, rigors, hypotension (in some cases followed by shock), multi-organ failure and even death if they enter the circulation.

Endotoxin units: Endotoxin levels are measured in terms of biological activity as Endotoxin Units (in the US) or International Units per ml. The units are related to the activity of a standard *E. coli* endotoxin. In 1997, the American and European Pharmacopoeias adopted a harmonised standard so that the EU and IU are now identical.

Exotoxin: Proteins secreted by micro-organisms to destabilise the function of their host. Exotoxins are small molecules with very specific actions, such blocking neural transmission or inhibiting protein synthesis. They may stimulate the body's immune system like endotoxins, but they cannot be detected by the LAL-test.

LAL (Limulus Amoebocyte Lysate) test: An assay used to detect endotoxins, which exploits the immune response of the horse shoe crab (*Limulus polyphemus*).

Microbiological contamination: Contamination with any form of micro-organism (e.g. bacteria, yeast, fungi and algae) and/or with the by-products of living or dead organisms such as endotoxins and exotoxins, such as microcystin, which is derived from blue-green algae.

Peptidoglycans: These pyrogenic substances are found in the cell walls of gram-positive bacteria in much higher quantities than in gram-negative bacteria. Peptidoglycans cannot be detected by the LAL-test but they can be assayed using Silkworm Larvae Reagent. Due to their ability to induce cytokines from blood cells they also can be analysed quantitatively by measuring the release of IL-1Ra (Interleukin-1-receptor-antagonist) in whole blood.

Point-of-use filtration: Filtration of the water and dialysis fluid at the dialysis machine to produce ultrapure dialysis fluid. Most current systems pass the dialysis fluid through at least two filters.

Pyrogen: A substance that can cause fever (elevation of body temperature to $> 37.8^{\circ}\text{C}$). Symptoms of a pyrogenic reaction may include chills, rigors, nausea, vomiting and hypotension.

Substitution (replacement) fluid: Very highly purified fluid produced from ultrapure dialysis fluid. Substitution fluid, which can be infused directly into the blood, must be sterile and non-pyrogenic. Guidelines on monitoring the quality of substitution fluid are given in Circulaire DGS/DH/AFSSAPS No 311 and SLS 2001 (see 1.1.3). The effects of treatment mode and patient size on allowable endotoxin levels are discussed in reference 1.

Ultrapure dialysis fluid: Highly purified dialysis fluid that can be used in place of conventional dialysis fluid. The definition of ultrapure dialysis fluid varies and probably reflects practical detection limits. The specification for ultrapure water used in the ERA/EDTA Guidelines, i.e. < 0.1 CFU/ml and < 0.03 IU/ml, is often used as a specification for ultrapure dialysis fluid. EDTNA/ERCA accept this specification, on the basis that ultrapure dialysis fluid must be further purified to produce substitution fluid.

Water treatment system: The entire system, including purification devices, pumps, monitoring systems and distribution systems, from the incoming water supply to the point of use.

1.1.5 Introduction

The ERA-EDTA Best Practice Guidelines for Dialysis Fluid Purity specify that water for the production of dialysis fluid should meet or exceed the requirements of the European Pharmacopoeia. References 2 to 6 of this document review the clinical arguments for the use of high quality dialysis fluid, a more extensive discussion and bibliography is provided in the ERA-EDTA Guidelines.

EP Monograph 1167 requires that water used for diluting concentrated haemodialysis solutions should have a total viable aerobic count of less than 100 CFU/ml and that the concentration of endotoxin should be less than 0.25 IU/ml.

The European Pharmacopoeia monograph for solutions for haemodialysis (EP 0128) does not give a clear requirement for the level of endotoxin in prepared dialysis fluid. The manufacturer of a concentrated solution must ensure that the solution has an endotoxin level of less than 0.5 IU/ml at the dilution used for dialysis. This could be interpreted as a limit of 1.25 IU/ml for bicarbonate dialysis fluid (where two concentrates are used), i.e. 0.5 IU/ml from each diluted concentrate plus 0.25 IU/ml from the water. This limit has not been widely adopted and, in practice, a much lower level

of contamination is easy to achieve so there is no reason why the dialysis fluid should not comply with the requirements of EP 1167 for microbiological contamination.

Lower levels for viable organisms and endotoxin in the water and/or dialysis fluid may be specified locally. Where ultrapure fluid is required, the limits will normally be < 0.1 CFU/ml and < 0.03 IU/ml.

This document provides practical guidance to help dialysis units produce water for dialysis that meets or exceeds the requirements for microbiological contamination in EP 1167, and for monitoring the quality of water and dialysis fluid. Although the guidelines are primarily intended for in-centre dialysis, the principles apply to home haemodialysis and self-care units, but the frequency of monitoring may have to be adapted.

The EP does not provide limits or suggest tests for other bacterial 'by-products', such as exotoxins or peptidoglycans. The Silkworm Larvae Reagent Assay (7) can be used to check for peptidoglycans if a substantial proportion of the bacteria in the water or dialysis fluid are gram positive. The growth of all micro-organisms should be minimised to reduce the levels of known and unknown harmful contaminants generated by living and dead organisms. Minimisation of bacterial growth is possible with good quality assurance (see Appendix).

For regulatory purposes, it is necessary to specify an 'acceptable' level of contamination, but there is mounting evidence to suggest that exposure to relatively low levels of endotoxin causes chronic inflammation and contributes to amyloidosis (8,9). There is increasing evidence linking inflammation to cardiovascular disease in the general public but the effect of inflammation on rates of mortality and morbidity in haemodialysis patients is still under debate. To be certain that the health of patients is not being compromised, dialysis units should aim to minimise their exposure to any detectable level of endotoxin.

Ideally, a water treatment and distribution system installed today should be designed to meet the requirements that will be in place in 7 to 10 years time. Whilst it is not possible to predict what the standard for dialysis-quality water will be in the future, it is likely that the maximum allowed levels of bacteria and endotoxin will be reduced. The ERA-EDTA guidelines advise dialysis units to work towards supplying ultrapure fluid routinely for all dialysis modalities.

Tighter control of microbiological contamination can only be achieved where the water distribution system is designed for very frequent automated disinfection. Frequent disinfection may be costly, but it will improve the water quality. Frequent monitoring to check for problems in a badly designed system is also costly, but testing does not improve quality (see Appendix). The extra cost of installing a system with automated daily heat disinfection is minimal when calculated as a cost per treatment over the lifetime of the plant.

1.1.6 Guidelines

1.1.6.1 Design and disinfection

Water treatment systems should be designed to be capable of producing water that meets the requirements for dialysis with a sustainable level of maintenance.

The water treatment system should be designed to minimise the formation of biofilm. Pipework with a smooth surface that resists corrosion and does not crack with age should be used for the distribution system. Internal ridges and/or grooves at the joints in the pipework should be minimised. Dead spaces and regions with low flow should be eliminated where possible. Where dead-end connectors to dialysis machines are used, they should be as short as possible.

Storage tanks in the distribution system provide a low flow zone where biofilm can form easily and should be avoided where possible. If treated water must be stored, the tank(s) should be designed to minimise bacterial growth and facilitate routine disinfection. An option to switch to direct feed by bypassing the tank is recommended.

The water treatment system should be designed to allow routine disinfection of the entire system, including the distribution pipework. An appropriate disinfection programme should be established when the system is installed or modified (see Appendix). The schedule may be based on information available for similar installations. Where no information is available, the reverse osmosis system and distribution pipework should be disinfected at least once a month.

The method of disinfection (heat or chemical) should be validated for use with the materials used in the distribution system. The disinfection programme should include the connections to the dialysis machines.

Rationale: Biofilm is the cause of persistent bacterial contamination of water and dialysis fluid (10). Connection and disconnection of dialysis machines and other devices mean that contamination of the distribution system with environmental bacteria cannot be avoided. If allowed to proliferate, the bacteria will form a biofilm. An established biofilm can be difficult, if not impossible to remove (11,12) [Evidence].

1.1.6.2 Frequency of microbiological testing

Water used for haemodialysis should be tested routinely to verify the efficacy of the disinfection programme, and to ensure that the water meets the requirements of the European Pharmacopoeia (total viable count < 100 CFU/ml and endotoxin level < 0.25 IU/ml) or the local specifications for purity.

Microbiological testing should be used to monitor the efficacy of the disinfection programme. When a water treatment system and/or distribution system is installed, the microbiological quality of the treated water should be checked at least once a week as part of the procedure for validating the disinfection programme. After validation, microbiological testing should be carried out at least once a month.

Trends in the test results should be monitored carefully, so testing must be frequent enough to pick up changes. If the trends show that the disinfection programme is not adequately controlling the proliferation of bacteria, the interval between disinfections should be reduced. Action should be initiated to reduce contamination before the allowed limits are reached (e.g. when the bacteria level exceeds 25 CFU/ml or the endotoxin level exceeds 0.125 IU/ml).

If a biofilm has become established, the test results should be treated with caution (see 1.1.8). The bacterial counts will drop after disinfection but may rebound soon after. High endotoxin levels and the appearance of fungi and yeasts in the water also indicate the presence of biofilm. Swabs taken from internal surfaces of the pipework can be cultured to confirm that a biofilm has formed. It may be possible to control the biofilm with extended disinfection times and/or more aggressive cleaning agents. If the levels of microbiological contamination remain high, the cause should be determined and the components responsible replaced.

Rationale: Good manufacturing, laboratory and clinical practices separate monitoring from control methods. In this case, the control of bacteria levels is the disinfection that takes place at regular intervals. Microbiological testing is the independent monitoring method [Opinion].

1.1.6.3 Sampling location, timing and techniques

Samples should be taken from the distribution system at the time and location expected to give the highest level of contamination, using a port designed for taking microbiological samples, and tested within 6 hours.

Microbiological contamination may vary with the consumption of water. Where treated water is stored, the levels may be higher following non-dialysis days. Samples should be taken at a consistent time, which should be when the levels are expected to be high.

A study of the variation of contamination with time should be carried out in order to establish the most appropriate sampling schedule. It may be necessary to repeat this study if the system is modified or the pattern of water consumption changes.

Samples should be taken from the point(s) expected to have the highest bacterial load, normally the end of the distribution loop, or the last machine point in a dead-end system, where the flow is lowest. If there are dead-end connections to the dialysis machines, samples should also be taken from the tubing to the machine. A sampling port designed for collecting samples for microbiological testing (e.g. an in-line septum port allowing mid-stream samples to be taken with a syringe) should be installed at this location. The manufacturer of the port should provide a validated procedure for taking samples.

If samples are taken from taps, the tap should be flame sterilised or chemically disinfected (e.g. by soaking with 70% ethanol or 80-90% isopropyl alcohol and allowing the alcohol to evaporate). When the tap is opened, at least 2 litres of water should be run off at a high flow before taking the sample. The sample should be taken without touching the tap as any movement of the valve may release biofilm.

Samples of dialysis fluid should also be taken from ports designed for collecting samples for microbiological testing, ideally a septum port in the line between the machine and the dialyser.

For endotoxin tests, the sample containers must be sterile and endotoxin-free, and made from material that does not adsorb endotoxin. Polystyrene does not normally adsorb endotoxin, while polypropylene should be avoided. Advice on containers should be sought from the laboratory carrying out the LAL tests or from the suppliers of LAL reagent.

Ideally, water samples should be tested immediately for bacteria and endotoxin. If the samples cannot be tested immediately they should be kept cool (< 10 °C), but not frozen. Where testing has to be delayed for more than 6 hours, the storage conditions should be validated. If necessary, dialysis units should consider training staff to test samples in-house. The LAL gel-clot test can be carried out relatively easily in a dialysis unit. The suppliers of the LAL reagent will normally provide training in the testing and validation procedures. Any in-house procedure for culturing bacteria should be validated by an accredited Microbiology Laboratory.

Rationale: Variation of microbiological contamination with consumption is more likely to occur in systems with storage tanks. It is important to establish the normal variability in levels to avoid misinterpreting results [Opinion].

Samples taken from taps may have poor reproducibility. In an EDTNA/ERCA study, several units measured higher endotoxin levels in samples taken from taps in the distribution circuit than from septum ports in the tubing to the dialysis machine (13). If samples must be stored, they should be kept cool to stabilise the level of bacteria. Repeated freezing can reduce the measurable endotoxin level. If it is necessary to transport samples on dry ice, the storage conditions should be validated [Opinion].

1.1.6.4 Techniques for culturing water borne micro-organisms

A culturing technique that is proven to give a good recovery of bacteria from purified water should be used. Levels of fungi and yeast should be monitored periodically using an appropriate technique.

Bacteria levels in water and dialysis fluid should be monitored using a culturing technique that is proven to give good recovery of bacteria from clean water.

The general technique for "microbiological examination of non-sterile product" described in the European Pharmacopoeia (Section 2.6.12) is not appropriate for dialysis water. The evidence suggests that a low nutrient agar, such as Tryptone Glucose Extract Agar or Reasoner's 2A, should be used (14-16) and that samples should be incubated for at least 7 days at room temperature (17). These conditions have been shown to give good recovery for most environmental bacteria found in purified water. Some species are better adapted for growth at a higher temperature and/or on richer media, but the long incubation time will allow most of these to grow.

If local regulations require testing for specific organisms (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*) with a specially adapted agar, a separate test should be conducted.

The inoculation volume should be chosen according to the allowed limit and the expected count. When testing to the requirements of EP 1167, a spread or pour plate inoculated with 1 to 5 ml of water is recommended. If the water is highly contaminated it can be diluted with water for injection to give a count. When testing ultrapure water, a sample of at least 100 mls should be filtered using a sterile 0.2 micron filter. The filter should then be cultured using the conditions above.

The number of colony forming units should be counted in a consistent way. Careful visual inspection under bright lighting is sufficient.

The European Pharmacopoeia does not give a specific limit for fungi and yeasts, as they are grouped in the total viable aerobic count. The Svensk läkemedelsstandard 2001 specifies a limit of 10 CFU/ml.

To monitor levels of fungi and yeasts, a large sample volume is normally required because these organisms adhere well to surfaces and appear at very low levels in the flowing water. The sample should be filtered through a 0.2 micron filter. Fungi and yeasts need more nutrients than bacteria and grow better on a richer agar (such as Malt Extract Agar or Sabouraud's Dextrose Agar). Incubation should be for 7 days at room temperature. It can be of interest to incubate plates for longer as some organisms, such as fungi, may take more than 7 days to grow. Testing for yeasts and fungi may be less frequent than for bacteria where levels of these organisms are consistently very low. They should not appear at all in a well-maintained system and are rarely seen in any system in the first year or so of operation.

Rationale: Comparisons of different test methods indicate that the recovery of bacteria from water used for dialysis is highest when a low nutrient agar, a long incubation time and a low temperature is used [Evidence].

The Swedish and French Standards listed in 1.1.3, and the ERA-EDTA Best Practice Guidelines, recommend testing for bacteria by incubating on Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) or Reasoner's 2A at 20-22 °C. The Swedish Standard recommends incubation for 5 days, the other documents prefer 7 days. The 7 day incubation is generally more convenient (as counts over the weekend can be avoided) and gives better recovery.

The above method should be regarded as the standard for water. Additional methods that are in current use, e.g. Cled agar or blood agar at 35-37 °C for at least 5 days, may be of interest but should not replace the standard. New techniques that give comparable or better recovery with a shorter incubation time must be validated against the standard method [Evidence and opinion].

1.1.6.5 Measuring endotoxin levels in water and dialysis fluid

Endotoxin levels should be measured using Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) by the gel-clot, turbidimetric or chromogenic method, or an equivalent test.

Bacterial endotoxin levels should be monitored using the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) assay, as recommended in the European Pharmacopoeia (Section 2.6.14). All the established techniques (gel-clot, turbidimetric and chromogenic) for LAL testing can be used for testing water for haemodialysis. Alternative techniques may be used provided they have been validated at endotoxin levels of 0.25 IU/ml or below.

The simplest form of LAL assay is the gel-clot test, which can be performed in the dialysis unit, provided staff have received the necessary training. It gives a pass-fail result, which is sufficient for testing water with a stable endotoxin level, but it can be made semi-quantitative by diluting the sample with endotoxin-free water.

The kinetic LAL tests (chromogenic, turbidimetric) measure the quantity of endotoxin in each sample directly, provided it is within the calibrated range. The kinetic tests are not often used in dialysis units as the equipment required is expensive and has significant operating overheads.

Dialysis fluid should be tested routinely for endotoxin to monitor the efficacy of the dialysis machine disinfection procedure. If the endotoxin levels in the dialysis fluid are significantly higher than in the water feeding the machine, the

disinfection schedule or the method used should be modified. If all machines are subject to the same procedures then a representative sample of machines can be tested each month.

Dialysis fluid samples should also be tested if a patient experiences a pyrogenic reaction during dialysis. A gel-clot test can be performed in about 1 hour to clarify the origin of the reaction.

When the LAL test is used to monitor endotoxin in dialysis fluid, the sample should be diluted at least 1:1 with endotoxin-free water to prevent interference with the clotting mechanism due to the bicarbonate (13). Note that LAL test works over a limited pH range so that it cannot be used to test the acid component of the dialysis fluid.

Rationale: From a clinical viewpoint, it is more important to test water and dialysis fluid for endotoxin than for bacteria, as bacteria do not pass through an intact dialyser membrane. There is still controversy over the transmembrane passage of bacteria-derived substances, but smaller bacterial endotoxins have been shown to cross all types of membrane (2,18-21). Hydrophobic high-flux membranes (such as polysulphone) can adsorb low molecular weight endotoxins (22), but the backfiltration zone that usually occurs in high flux dialysers could allow these molecules to pass into the blood if there is any damage to the membrane [Evidence].

The LAL assay is the method recommended for endotoxin testing by the European Pharmacopoeia, and is widely used to test non-pyrogenic products in the pharmaceutical industry. However, staff should be aware that the LAL assay will not detect all pyrogenic substances derived from bacteria (7,23).

1.1.7 Outcome measures

The implementation of this guideline should be audited by reviewing the record of bacterial counts and endotoxin measurements over time. The record should show planned test dates, actual test dates and the results obtained. Adherence to the disinfection schedule should also be audited.

If routine measurements of pre and post dialysis body temperature and/or markers of inflammation such as C-reactive protein (CRP) are available for unselected groups of patients, these should be audited periodically to look for trends that may be related to water quality. Non-routine measurements, and measurements made only on selected ('at-risk') patients must not be used for this purpose.

The dialysis unit should have documented procedures that come into effect when the European Pharmacopoeia (or local) limits for contamination are exceeded. The ERA-EDTA Best Practice Guidelines state that the procedures should include temporary closure of the dialysis unit when the safe limits for contaminants are exceeded. The content of these procedures must be reviewed regularly. The ability of staff to implement the procedures effectively should also be checked.

1.1.8 References

1. Nystrand R. Endotoxin and "on line" production of substitution fluid in haemodiafiltration and haemofiltration. EDTNA/ERCA Journal 2002; Jul; 28 (3).
Dr Nystrand describes how endotoxin levels are controlled and monitored in substitution fluid. He also presents a simple method for calculating the allowed endotoxin levels based on pharmaceutical standards, patient size and treatment mode.
2. Mion CM, Canaud B, Garred LJ, Stec F, Nguyen QV. Sterile and pyrogen-free bicarbonate dialysate: a necessity for hemodialysis today. Advanced Nephrology 1990; 19: 275-314.
Although somewhat dated, this visionary paper provides an excellent overview of the arguments for using cold sterilisation to produce pyrogen-free dialysis fluid. The sections describing the formation of metabolites and degradation products from different types of organism, and the transfer of these toxins into the blood, are particularly interesting.
3. Brunet P, Berland Y. Water quality and complications of haemodialysis. Nephrology, Dialysis and Transplantation 2000; 15: 578-580.
A brief review of the clinical complications of exposure to microbiological contamination, including amyloidosis, atherosclerosis and malnutrition from which the authors conclude that the level of bacteria and endotoxin in dialysis fluid should be < 100 CFU/L and < 0.01 EU/ml.
4. Bonnie-Schorn E, Grassmann A, Uhlenbusch-Körwer I, Weber C, Vienken J. Clinical consequences of microbial contamination. In "Water Quality in Haemodialysis", Lengerich: Pabst Science Publishers 1998; 69-79.
This overview of the clinical consequences microbiological contamination of dialysis water and dialysis fluid is part of an excellent textbook for technicians and other renal care staff.
5. Lonnemann G. Should ultra-pure dialysate be mandatory? Nephrology, Dialysis and Transplantation 2000; 15 (1): 55-59.
Dr Lonnemann describes acute and long-term effects of haemodialysis with contaminated dialysis fluid. He recommends maintaining bacteria levels at less than 100 CFU/ml in dialysis fluid and mentions the need for guidelines for sampling and culturing dialysis fluid. The paper concludes that 'the use of pyrogen-free dialysis fluid should become mandatory as soon as further studies reveal that dialysis-associated diseases can be ameliorated or prevented by the use of ultra-pure dialysate'.

6. Ward RA. **Ultrapure dialysate: a desirable and achievable goal for routine hemodialysis.** *Seminars in Dialysis* 2000; 13 (6): 378-380.
This paper gives the case for using ultrapure dialysis fluid and shows that there are no longer any real technological barriers preventing renal units from producing ultrapure fluid.
7. Tsuchida K, Takemoto Y, Yamagami S, Edney H, Niwa M, Tsuchiya M, Kishimoto T, Shaldon S. **Detection of peptidoglycan and endotoxin in dialysate, using silkworm larvae plasma and limulus amebocyte lysate methods.** *Nephron* 1997; 75 (4): 438-443.
The authors used an assay based on silkworm larvae plasma (SLP) reagent to measure muramyl dipeptide (MDP), the biologically active constituent of peptidoglycan, which is a fragment of both the gram-positive and gram-negative bacterial cell wall. This pyrogen is not detected by the LAL assay. The authors not only showed that MDP is present in some dialysis fluid samples, but that cytokine production was 5-10 times higher where MDP and endotoxin coexisted than where either MDP or ET existed alone.
8. Schönmig M, Eisenhardt A, Ritz E. **The microinflammatory state of uremia.** *Blood Purification* 2000; 18: 327-332.
An easy-to-follow review of the links between inflammation, malnutrition and cardiovascular mortality. This paper shows the striking relationship between high levels of C-reactive protein (a measure of inflammation) and poor survival. The authors list poor quality water as amongst the causes of inflammation in HD patients.
9. Lonnemann G. **Chronic inflammation in hemodialysis: the role of contaminated dialysate.** *Blood Purification* 2000; 18 (3): 214-223.
A review of recent experimental and clinical data suggesting that the use of pyrogen-free dialysis fluid improves the state of chronic inflammation, as indicated by decreased plasma levels of C-reactive protein in chronic haemodialysis patients.
10. Cappelli G, Ballestri M, Perrone S, Ciuffreda A, Inguaggiato P, Albertazzi A. **Biofilms invade nephrology: effects in hemodialysis.** *Blood Purification* 2000; 18 (3): 224-230.
Describes how bacteria attach to surfaces and aggregate in a biopolymer matrix to form a biofilm which produces slime that renders the chemical products for disinfection and descaling procedures ineffective.
11. Stickler D. **Biofilms.** *Current Opinions in Microbiology* 1999; Jun 2 (3): 270-275.
A review of the war against biofilms, though not specific to dialysis. Bacteria in biofilms are up to 500 times more resistant to antimicrobials than free bacteria. The author points out that the most effective method for removing mature biofilms is mechanical cleaning, which is not usually an option in a dialysis unit.
Another good general review of biofilms by JW Costerton and PS Stewart was published in Scientific American in July 2001. This includes a picture of undamaged bacteria in the interior of a biofilm after 60 minutes of exposure to bleach. The authors are based at the "Center for Biofilm Engineering" at Montana State University. Still images and videos of biofilms can be viewed at the center's web site (<http://www.microbelibrary.org>, select "Visual Resources" and search the library using "Biofilm" as a Keyword).
12. Meiller TF, Depaola LG, Kelley JI, Baqui AA, Turng BF, Falkler WA. **Dental unit waterlines: biofilms, disinfection and recurrence.** *Journal of American Dental Association* 1999; Jan 130 (1): 65-72.
Much of the literature on biofilms comes from the dental community where the transmission of microbial pathogens to patients from biofilm within dental unit waterlines is a concern. These trials demonstrated that whilst chemical disinfectants reduce levels of micro-organisms in the effluent water, the biofilm was not destroyed even with periodic treatments, and the waterlines were rapidly recolonized.
13. Lindley EJ, Lopot F, Harrington M, Elseviers MM. **Treatment of water for dialysis – A European survey.** *EDTNA/ERCA Journal* 2000; Oct 26 (4): 34-40.
A report on the Collaborative Research Programme survey of water treatment practice which included a standard endotoxin test. In 6 of 9 centres where the distribution system had an endotoxin level > 0.125 IU/ml, the sample from the septum port in the machine tubing was negative, suggesting that the system samples were contaminated with biofilm from the tap.
The study also showed that the dialysis fluid could not be tested for endotoxin using the gel-clot test without dilution as the electrolytes interfere with the clotting process.
14. van der Linde K, Lim BT, Rondeel JM, Antonissen LP, de Jong GM. **Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media.** *Nephrology, Dialysis and Transplantation* 1999; Oct 14 (10): 2433-2437.
This study compared TSA and R2A using 229 samples of water and dialysis fluid. 0.1 ml spread plates were incubated for 10 days of incubation at 25 °C. Reasoner's 2A gave significantly higher colony counts than Tryptic Soy Agar for both water and dialysis fluid.
15. Ledebo I, Nystrand R. **Defining the microbiological quality of dialysis fluid.** *Artificial Organs* 1999; Jan 23 (1): 37-43.
This study showed a 10-100 fold increase in recovery of bacteria from dialysis fluid incubated on Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) at 20 °C for 5 days compared with incubation on Tryptic Soy Agar at 37 °C for 2 days.

16. Harding GB, Pass T, Million C, Wright R, DeJarnette J, Klein E. Bacterial contamination of hemodialysis center water and dialysate: are current assays adequate? *Artificial Organs* 1989; Apr 13 (2): 155-159.
Compared Tryptic Soy Agar, Plate Count Agar and Reasoner's 2A and found that R2A had a strong selectivity for water-borne bacteria.
17. Pass T, Wright R, Sharp B, Harding GB. Culture of dialysis fluids on nutrient-rich media for short periods at elevated temperatures underestimate microbial contamination. *Blood Purification* 1996; 14 (2): 136-145.
Compared counts at 37 °C for 48 hours and at 23 °C for 48, 72, 168 hours using Standard Methods Agar, Reasoner's 2A and nutrient-rich Tryptic Soy Agar. Increased colony counts over time occurred for all three fluids. Counts were greater on the lower nutrient agars. The 7 day, room temperature cultivation gave up to 104 times the count for standard 48-hour TSA cultures.
18. Urena P, Herbelin A, Zingraff J, Lair M, Man NK, Descamps-Latscha B, Drueke T. Permeability of cellulosic and non-cellulosic membranes to endotoxin subunits and cytokine production during in-vitro haemodialysis. *Nephrology, Dialysis and Transplantation* 1992; 7: 16-28.
This study showed that radiolabelled endotoxin in the dialysis fluid could transfer into the blood with cellulosic, polyacrylonitrile and polysulphone membranes.
19. Laude-Sharp M, Caroff M, Simard L, Pusineri C, Kazatchkine MD, Haeffner-Cavaillon N. Induction of IL-1 during hemodialysis: transmembrane passage of intact endotoxins (LPS). *Kidney International* 1990; Dec 38 (6): 1089-1094.
This study demonstrated that intact bacterial lipopolysaccharide (LPS) molecules can cross cuprophane, AN69 and polysulfone membranes under simulated dialysis conditions. 40 to 70% of the LPS originally present in the dialysis fluid was adsorbed onto the AN69 and polysulphone membranes while the cuprophane membrane adsorbed very little LPS.
20. Lonnemann G, Behme TC, Lenzner B, Floege J, Schulze M, Colton CK, Koch KM, Shaldon S. Permeability of dialyzer membranes to TNF alpha-inducing substances derived from water bacteria. *Kidney International* 1992; Jul 42 (1): 61-68.
The authors used a sterile filtrate of Pseudomonas maltophilia grown from standard bicarbonate dialysis fluid was used to test the permeability of various dialyzer membranes (regenerated cellulose, cellulose triacetate, polyacrylonitrile, polysulfone and polyamide) to TNF alpha-inducing bacterial substances. The transfer of TNF-inducing activity to the blood side of the dialyser was most rapid for the low-flux regenerated cellulose dialyser and lowest for the polysulphone and polyamide dialysers. The authors suggest that the synthetic membranes may adsorb the bacteria-derived substances.
21. Pereira BJ, Snodgrass BR, Hogan PJ, King AJ. Diffusive and convective transfer of cytokine-inducing bacterial products across hemodialysis membranes. *Kidney International* 1995; Feb 47 (2): 603-610.
In this in-vitro study, bicarbonate dialysis fluid contaminated with Pseudomonas maltophilia filtrate was circulated through the dialysis fluid compartment of polyamide and hemophane dialysers whole human blood in the blood side. Cytokine production in the blood due to the passage of bacterial toxins was found to lower in the high-flux polyamide dialyser compared to the cellulosic hemophane dialyser.
22. Weber C, Linsberger I, rafiee-Tehrani M, Falkenhagen D. Permeability and adsorption capacity of dialysis membranes to lipid A. *Int J Artif Organs* 1997; 20(3): 144-152.
This paper describes the controversy over the transmembrane passage of bacteria-derived substances and describes an in-vitro study in which dialyser membranes were challenged with low and high molecular weight endotoxin (lipid A from E. Coli and lipopolysaccharides from Pseudomonas aeruginosa). The results showed that polysulphone and polyamide membranes have a much higher adsorption capacity for lipid A and LPS than the cellulosic membranes. In this study, good rejection of endotoxin was also observed with hydrophilic membranes and the authors attribute this to aggregation of the molecules.
23. Bonnie-Schorn E, Grassmann A, Uhlenbusch-Körwer I, Weber C, Vienken J. Clinical consequences of microbial contamination. In "Water Quality in Haemodialysis", Lengerich: Pabst Science Publishers 1998; 29-34.
A review of the methods for detecting pyrogens and other biologically active substances. For more details about this book see reference 4.

1.1.9 Appendix: Quality assurance or Quality control?

Quality assurance (QA), applied to production of water for dialysis, means designing and maintaining the entire system for the production and distribution of purified water to a standard that ensures that the water meets or exceeds the requirements of the European Pharmacopoeia. This will include preventing the proliferation of bacteria. In the context of quality assurance, bacteria levels are monitored for the purpose of audit only.

QA is provided by modern water distribution systems with high quality pipework, minimal dead space and automated heat disinfection. Daily or twice weekly disinfection is required to prevent bacteria growth on the surfaces of the distribution system. In most units this is feasible only with an automated disinfection procedure that is easy for dialysis unit personnel to use. Heat disinfection is amenable to automation and can be left unattended. It also eliminates the need to handle chemicals and carries no risk for the patients as all the dialysis machines have high temperature alarms.

82

Internal quality control (QC) involves the analysing of samples to find out if they meet the criteria for acceptability. If a sample fails the QC test, appropriate action is taken. When monitoring water for dialysis, QC measurements showing a increasing trend in counts may be used to adapt the maintenance schedule, for example by initiating a disinfection. Most water distribution systems in current use were designed with no provision for routine disinfection or for cold chemical disinfection at long intervals. With such systems, bacteria are allowed to proliferate and QC tests are required to check that the water quality is acceptable. When contamination exceeds the allowed limits, the bacteria must be destroyed. The disinfection processes required are time consuming (and have to be undertaken outside normal operating hours) and are not without risk to the staff and patients.

These systems are difficult to keep clean because bacterial biofilm can build up during the interval between disinfections, and because the disinfectant cannot penetrate biofilm and destroy bacteria that are deeply embedded. They are also very difficult to monitor effectively because bacteria levels obtained by culturing the viable organisms in a mid-stream sample gives a very limited indication of the number of bacteria in the system.

Even with the best incubation techniques, there will be some bacteria that do not grow and some colony forming units that contain more than one viable organism. And even if the culture technique could recover every organism in the flowing water, it cannot show the extent to which the distribution system is colonised. To understand this, it is necessary to gain some insight into the life of micro-organisms and the difficult job of the microbiologist.

Nutrients are mainly organic molecules with electrical charges that are attracted to surfaces. Bacteria will try to adhere to surfaces to be where their food is – the ones that fall off are the losers. Species that adhere well will rarely be seen in the flowing water. Pieces of biofilm that come unstuck will contain many cells, but will appear as '1 CFU'. So the microbiologist performing the QC tests sees only the colonies formed from the pieces of biofilm that have been lost from the surface that will grow in his cultivation conditions. This is a tiny fraction (perhaps 1/100000) of the actual number in the system.

Internal QC can be used to keep the measured level of microbiological contamination below the EP limits it relies on the ability of staff to keep the growth of bacteria under control. Over the lifetime of a system this will inevitably become more difficult. With the QA approach, there is no build-up of resistant biofilm, so there is no reason why the system should not continue to produce high quality water as long as the maintenance schedule is followed.

1.1.10 Acknowledgements

This document was prepared by the Research Board and the Technicians Special Interest Group of EDTNA/ERCA with advice from Dr Rolf Nystrand, Microbiology Advisor to EDTNA/ERCA.

A panel of experts, including representatives from industry and regulatory bodies, as well technical and clinical staff from dialysis units in Europe and North America, provided comments and criticism as the document passed through three revisions during 2000-01.

EDTNA/ERCA thanks all those involved for their help in producing a document that will help our members improve the quality of the care they provide to dialysis patients throughout the world, especially:

Matthew J. Arduino, Environmental and Applied Microbiology Section, Centers for Disease Control & Prevention, USA; Bernard Canaud, Department of Nephrology, Lapeyronie Hospital, Montpellier, France, President-elect of the French Dialysis Society and Expert member of AFFSAPS on behalf of the *European Renal Association/European Dialysis and Transplant Association*; Jim Cooper, Charles River Endosafe, Charleston, USA; Jean-Yves De Vos, Werken Glorieux, Ronse, Belgium; David J Evans, Fresenius Medical Care GmbH, Huthwaite, UK; LeRoy J Fischbach, Minntech Corporation, Minneapolis, USA and AAMI Renal Disease and Detoxification Committee Co-Chair*; Alois Gorke, Kreis-krankenhaus, Murnau, Germany; Roger Greenwood, Renal Unit, Lister Hospital, Stevenage, UK; Maurice Harrington, Renal Unit, Hope Hospital, Salford, UK; Dan Jonsson, Gambro, Lund, Sweden; Stephan Krietemayer, Lauer Membran Wassertechnik, Germany; Elizabeth Lindley, Dept of Renal Medicine, St James's University Hospital, Leeds, UK; Franta Lopot, Dept of Internal Medicine, Charles University Medical School, Prague, Czech Republic; Thomas Ludewig, TÜV Product Service, Munich, Germany; Ian Morgan, Renal Unit, King's College Hospital, London, UK; Rolf Nystrand, Bio-TeQ Nystrand Consulting, Malmö, Sweden; Hans Polaschegg, Medical Devices Consultant, Köstenberg, Austria; Bernd Stegmayr, Nephrology Division, Norrlands Universitets Sjukhus, Umeå, Sweden on behalf of the *European Society for Artificial Organs*; André Stragier, Clinique Saint-Luc, Brussels, Belgium; James Tattersall, Basildon District Hospital, UK; Hans Träger, Werner GmbH, Leverkusen, Germany; Richard A. Ward, University of Louisville, Kentucky, USA, and AAMI Water for Hemodialysis Working Group Chair*

* Input from Lee Fischbach and Dick Ward was in their role as individuals and should not be seen as representing the views of AAMI.

Lineamientos EDTNA/ERCA:

Sección técnica

1 Aseguramiento de la calidad del agua para diálisis y del líquido de diálisis

1.1 Lineamientos para el control y monitoreo de la contaminación microbiológica del agua para diálisis

1.1.1 Alcance

Estos lineamientos se aplican al control y monitoreo de contaminación microbiológica en:

- agua usada para preparar líquido de diálisis en todos los ámbitos, incluyendo la casa de los pacientes y las unidades de cuidados intensivos
- agua usada para la producción interna de concentrados líquidos
- agua usada para reprocesamiento de dializadores
- agua usada para preparar líquido de diálisis ultrapuro por equipos que dispongan de filtración de punto de uso adicional

Estos lineamientos deben tenerse en cuenta cuando se diseñen y modifiquen los sistemas de tratamiento de agua y distribución. La calidad microbiológica es afectada por todos los componentes del sistema de tratamiento de agua, desde los dispositivos de pretratamiento hasta el punto de uso. Los proveedores de todos los componentes deben asegurarse de que sus productos son compatibles con estos lineamientos. Cuando se ensambla la instalación completa usando componentes de diferentes proveedores, el personal de la unidad renal debe asumir toda la responsabilidad de la implementación de los lineamientos.

La calidad microbiológica del agua durante la vida del sistema dependerá del mantenimiento. La responsabilidad por la especificación y validación del método y la frecuencia de desinfección puede estar en un proveedor o en el personal de la unidad renal. Esto debe establecerse antes de que el sistema se ponga en uso.

Aunque el manejo diario de la calidad del agua usada para diálisis se delega normalmente en el personal técnico, la responsabilidad final de la calidad del agua estará en el médico o farmacéutico responsable del servicio de diálisis, o en el equipo encargado, de acuerdo con las regulaciones nacionales. Para reflejar este proceso multidisciplinario, estos lineamientos han sido revisados y aprobados por la Sociedad Europea de Órganos Artificiales (ESAO) y por la Asociación Renal Europea/Asociación Europea de Diálisis y Trasplantes (ERA-EDTA).

1.1.2 Excepciones

Estos lineamientos no aplican para el agua usada en la preparación de líquido de diálisis disponible comercialmente o líquido de sustitución suministrado en bolsas estériles.

1.1.3 Estándares y lineamiento aplicables

Monografía 1167:1997 (corregida en 2000, reimpressa en 2001) Haemodialysis solutions, concentrated, water for diluting. *Farmacopea Europea* Suplemento 2001.

Monografía 0128:2000: Haemodialysis, solutions for. *Farmacopea Europea* Suplemento 2001.

Circulaire DGS/DH/AFSSAPS No 311 relative aux spécifications techniques et à la sécurité sanitaire de la pratique de l'hémofiltration et de l'hémodiafiltration en ligne dans les établissements de santé. [Especificaciones técnicas y seguridad médica de hemofiltración y hemodiafiltración en línea utilizadas en instituciones de salud] 7 de junio de 2000 (Francés).

Tillverkning och hantering av hemodialysvätskor och hemofiltrationsvätskor inom sjukvården. [Fabricación y manipulación de líquidos para hemodiálisis y hemofiltración en la atención médica] *Svensk läkemedelsstandard (SLS) 2001 (Suecia)*.

ERA-EDTA European Best Practice Guidelines for Haemodialysis: IV. Dialysis fluid purity. *Nephrology, Dialysis and Transplantation* 2002, Suplemento (en imprenta).

1.1.4 Glosario

Para el propósito de estos lineamientos, aplicarán las siguientes definiciones:

Biopelícula: Un recubrimiento sobre superficies que consiste en microcolonias de bacterias adheridas a una matriz extracelular de protección. La matriz, un material viscoso secretado por las células, protege a las bacterias de antibióticos y desinfectantes.

Unidades formadoras de colonia (UFC): Un organismo capaz de replicarse para formar una colonia distinta, visible en una placa de cultivo. En la práctica, una colonia puede estar formada por un grupo de organismos.

Líquido concentrado para diálisis: Una solución de químicos que, cuando se diluyen apropiadamente, produce el líquido para diálisis (definición de IEC 60601-2-16 2.107). Los concentrados pueden comprarse como soluciones listas o como un polvo que se debe disolver antes de usar. Están sujetos a los requisitos de la Monografía FE 0128:2000.

Líquido de diálisis: Una solución que pretende intercambiar solutos y/o agua con sangre durante la hemodiálisis o hemodiafiltración (definición de IEC 60601-2-16 2.107). El "dialisato" se utiliza comúnmente en lugar del líquido para diálisis, aunque este término debe reservarse para el líquido contaminado que deja el dializador.

Desinfección: La destrucción de microorganismos por medios químicos o físicos (e.g. calor o radiación UV). La desinfección es un proceso menos letal que la esterilización, ya que se espera que destruya los microorganismos patógenos más reconocidos, pero no necesariamente todos los presentes. La desinfección no elimina la endotoxina u otros subproductos bacterianos, como las exotoxinas.

Sistema de distribución: La tubería, junto con cualquier tanque, bomba, filtro, unidad de irradiación asociados, utilizada para transportar agua tratada a la máquina de diálisis. Las conexiones a las máquinas de diálisis también hacen parte del sistema de distribución.

Endotoxina: Un grupo de sustancias pirógenas (lipopolisacáridos) que forman una parte estructural de la pared celular exterior de las bacterias Gram negativas. Bajo

estrés o durante la proliferación, la endotoxina puede liberarse de la bacteria. Las endotoxinas pertenecen al grupo de sustancias inductoras de citoquinas y, si entran en la circulación, pueden causar fiebre, escalofríos, hipotensión (en algunos casos, seguido por choque), insuficiencia de múltiples órganos e incluso la muerte

Unidades de endotoxina: Los niveles de endotoxina se miden en términos de actividad biológica como Unidades de Endotoxina (en los EE.UU.) o Unidades Internacionales por ml. Las unidades están relacionadas con la actividad de una endotoxina estándar de E. Coli. En 1997, las farmacopeas americana y europea adoptaron un estándar armonizado para que las UE y las UI ahora sean idénticas.

Exotoxina: Proteínas secretadas por microorganismos para desestabilizar la función de su anfitrión. Las exotoxinas son pequeñas moléculas con acciones muy específicas, como bloquear la transmisión nerviosa o inhibir la síntesis de proteínas. Pueden estimular el sistema inmunológico del cuerpo como las endotoxinas, pero no pueden detectarse por la prueba LAL.

Prueba LAL (lisado de amibocitos de Limulus): Ensayo para detectar endotoxinas, que explota la respuesta inmunológica del cangrejo de herradura (Limulus polyphemus).

Contaminación microbiológica: Contaminación con cualquier forma de microorganismo (e.g. bacterias, levaduras, hongos y algas) y/o con los subproductos de organismos vivos o muertos como las endotoxinas y exotoxinas, como la microcistina, que se deriva de algas verde azules.

Peptidoglicanos: Estas sustancias pirógenas se encuentran en mayores cantidades en las paredes celulares de las bacterias Gram positivas que en las bacterias Gram negativas. Las peptidoglicanos no pueden detectarse por la prueba LAL, pero pueden analizarse utilizando el reactivo de larvas de gusano de seda. Dada su capacidad para inducir citoquinas a partir de células de la sangre, también pueden analizarse cuantitativamente mediante la medición de la liberación de IL-1Ra (interleucina-1-receptor-antagonista) en toda la sangre.

Filtración de punto de uso: Filtración del agua y del líquido de diálisis en la máquina de diálisis para producir líquido de diálisis ultrapuro. La mayoría de los sistemas actuales pasan el líquido de diálisis a través de, por lo menos, dos filtros.

Pirógeno: Sustancia que puede provocar fiebre (elevación de la temperatura corporal a $> 37,8^{\circ}\text{C}$). Los síntomas de una reacción pirógena pueden incluir escalofríos, temblores, náuseas, vómitos e hipotensión.

Líquidos de sustitución (reemplazo): Líquido altamente purificado, producido a partir del líquido de diálisis ultrapuro. El líquido de sustitución, que puede administrarse directamente en la sangre, debe ser estéril y no pirógeno. Los lineamientos para monitorear la calidad del líquido de sustitución se encuentran en la Circulaire DGS/DH/AFSSAPS No. 311 y SLS 2001 (ver 1.1.3). Los efectos del modo de tratamiento y el tamaño del paciente en los niveles de endotoxina permitidos se discuten en la referencia 1.

Líquido de diálisis ultrapuro: Líquido de diálisis altamente purificado que puede usarse en lugar del líquido de diálisis convencional. La definición de líquido de diálisis ultrapuro varía y probablemente refleja los límites prácticos de detección. La especificación usada en los lineamientos ERA/EDTA, i.e. $< 0,1\text{ CFU/ml}$ y $< 0,03\text{ UI/ml}$ para agua ultrapura, se usa a menudo como una especificación para el líquido de diálisis ultrapuro. La EDTNA/ERCA acepta esta especificación sobre la base de que el líquido de diálisis ultrapuro debe ser más purificado para producir líquido de sustitución.

Sistema de tratamiento de agua: Es todo el sistema, incluyendo los dispositivos de purificación, bombas, sistemas de monitoreo y sistemas de distribución, desde el suministro de agua entrante hasta el punto de uso.

1.1.5 Introducción

Los lineamientos de las mejores prácticas para la pureza del líquido de diálisis de ERA-EDTA especifican que el agua para la producción del líquido de diálisis debe cumplir o superar los requisitos de la Farmacopea Europea. Las referencias 2 a 6 de este documento reseñan los argumentos clínicos para usar el líquido de diálisis de alta

calidad, se suministra bibliografía y un análisis más extenso en los lineamientos ERA-EDTA.

La Monografía FE 1167 exige que el agua usada para diluir soluciones concentradas de hemodiálisis tenga un recuento total de aerobios viables de menos de 100 CFU/ml. y que la concentración de endotoxina sea menor a 0,25 UI/ml.

La monografía de la Farmacopea Europea para soluciones de hemodiálisis (FE 0128) no proporciona un requisito claro del nivel de endotoxina en el líquido de diálisis preparado. El fabricante de una solución concentrada debe asegurarse de que la solución tenga un nivel de endotoxina menor a 0,5 UI/ml. en la dilución utilizada para diálisis. Esto puede interpretarse como el límite de 1,25 UI/ml. para el líquido de diálisis de bicarbonato (donde se usan dos concentrados), i.e. 0,5 UI/ml. de cada concentrado diluido más 0,25 UI/ml. del agua. Este límite no ha sido adoptado ampliamente y, en la práctica, es fácil alcanzar un nivel mucho más bajo de contaminación, así que no hay razón para que el líquido de diálisis no cumpla con los requerimientos de FE 1167 relacionados con la contaminación microbiológica.

Localmente deben especificarse los niveles más bajos de organismos viables y de endotoxina en el agua y/o en el líquido de diálisis. Donde se requiera líquido ultrapuro, los límites normales serán $< 0,1$ CFU/ml. y $< 0,03$ UI/ml.

Este documento proporciona una guía práctica para ayudar a las unidades de diálisis a producir agua para diálisis que cumpla o supere los requisitos de contaminación microbiológica de la FE 1167, y para monitorear la calidad del agua y el líquido de diálisis. Aunque los lineamientos están destinados principalmente para los centros de diálisis, los principios aplican para hemodiálisis domiciliaria y unidades de autocuidado, pero la frecuencia de monitoreo tendrá que adaptarse.

La FE no proporciona límites o sugiere pruebas para otros "subproductos" bacterianos, como las exotoxinas o los peptidoglicanos. El ensayo reactivo de larvas de gusano de seda (7) se puede utilizar para detectar peptidoglicanos si una proporción sustancial de las bacterias en el agua o en el líquido para diálisis son Gram positivas. El crecimiento de todos los microorganismos debe minimizarse para reducir los niveles de contaminantes dañinos conocidos y desconocidos generados por

organismos vivos o muertos. La minimización del crecimiento bacteriano es posible con la garantía de buena calidad (ver Anexo).

Para efectos regulatorios, es necesario especificar un nivel "aceptable" de contaminación, pero cada vez hay más evidencia que sugiere que la exposición a niveles relativamente bajos de endotoxina causa inflamación crónica y contribuye a la amiloidosis (8.9). Existe una creciente evidencia que vincula la inflamación con la enfermedad cardiovascular en la población en general, pero el efecto de la inflamación en las tasas de mortalidad y morbilidad de pacientes en hemodiálisis sigue siendo objeto de debate. Para estar seguros de que la salud de los pacientes no está en peligro, las unidades de diálisis deben tratar de minimizar su exposición a cualquier nivel detectable de endotoxina.

Lo ideal es que un tratamiento de agua y el sistema de distribución instalado hoy en día estén diseñados para cumplir con los requerimientos vigentes de aquí a 7 o 10 años. Aunque no es posible predecir cuál será el estándar del agua de calidad para diálisis en el futuro, es probable que los niveles máximos permitidos de bacterias y endotoxinas se reduzcan. Los lineamientos ERA-EDTA asesoran a las unidades de diálisis para trabajar hacia el suministro rutinario de líquido ultrapuro en todas las modalidades de diálisis.

Un control más estricto de la contaminación microbiológica sólo se alcanzará cuando el sistema de distribución del agua esté diseñado para una frecuente desinfección automatizada. La desinfección frecuente puede ser costosa, pero mejorará la calidad del agua. El monitoreo frecuente para detectar problemas en un sistema mal diseñado también es costoso, pero el análisis no mejora la calidad (ver Anexo). El costo extra de instalar un sistema con una diaria desinfección térmica automatizada es mínimo cuando se calcula como un costo por tratamiento durante toda la vida útil de la planta.

1.1.6 Lineamientos

1.1.6.1 Diseño y desinfección

Los sistemas de tratamiento de agua deben diseñarse para ser capaces de producir agua que cumpla con los requerimientos para diálisis con un nivel sostenible de mantenimiento.

El sistema de tratamiento de agua debe diseñarse para minimizar la formación de la biopelícula. Las tuberías con una superficie lisa, que resista la corrosión y que no se agriete con los años, deben usarse para el sistema de distribución. Los bordes y muescas internos en las uniones de las tuberías deben minimizarse. Los espacios muertos y las regiones con bajo flujo deben eliminarse cuando sea posible. Donde se utilicen conectores sin salida para máquinas de diálisis, estos deben ser tan cortos como sea posible.

Los tanques de almacenamiento del sistema de distribución proporcionan una zona de bajo flujo donde puede formarse biopelícula fácilmente y, en lo posible, debe evitarse. Si el agua tratada debe almacenarse, el(los) tanque(s) debe estar diseñado para minimizar el crecimiento de bacterias y facilitar una rutina de desinfección. Se recomienda una opción para cambiar a alimentación directa sin que pase por el tanque.

El sistema de tratamiento de agua debe diseñarse para permitir una rutina de desinfección total del sistema, incluyendo la tubería de distribución. Se debe establecer un programa de desinfección adecuado cuando el sistema se instale o se modifique (ver Anexo). El programa puede basarse en información disponible para instalaciones similares. Cuando no se disponga de información, el sistema de ósmosis inversa y la tubería de distribución deben desinfectarse al menos una vez al mes.

El método de desinfección (térmico o químico) debe validarse para ser usado con los materiales utilizados en el sistema de distribución. El programa de desinfección debe incluir las conexiones a las máquinas de diálisis.

Razón: La biopelícula es la causa de la persistente contaminación bacteriana del agua y el líquido para diálisis (10). Conectar y desconectar las máquinas de diálisis y otros

dispositivos significa que no se puede evitar la contaminación del sistema de distribución con las bacterias ambientales. Si se les permite proliferar, las bacterias formarán una biopelícula. Una biopelícula adherida puede ser difícil, sino imposible, de eliminar (11,12) [Evidencia].

1.1.6.2 Frecuencia de análisis microbiológicos

El agua utilizada para hemodiálisis debe analizarse rutinariamente para verificar la eficacia del programa de desinfección, y para asegurarse de que el agua cumpla con los requerimientos de la Farmacopea Europea (recuento viable total < 100 XFU/ml. y nivel de endotoxina < 0.25 UI/ml.) o con las especificaciones locales de pureza.

Los análisis microbiológicos deben usarse para monitorear la eficacia del programa de desinfección. Cuando se instala un sistema de tratamiento de agua y/o un sistema de distribución, la calidad microbiológica del agua tratada debe comprobarse al menos una vez a la semana como parte del proceso para validar el programa de desinfección. Después de la validación, los análisis microbiológicos deben llevarse a cabo al menos una vez al mes.

Las tendencias en los resultados del análisis deben monitorearse cuidadosamente, así que los análisis deben ser lo suficientemente frecuentes para identificar cambios. Si las tendencias muestran que el programa de desinfección no está controlando adecuadamente la proliferación de bacterias, el intervalo entre las desinfecciones debe reducirse. Se deben iniciar acciones para reducir la contaminación antes de alcanzar los límites permitidos (e.g. cuando el nivel de bacterias excede los 25 CFU/ml. o el nivel de endotoxinas excede las 0,125 UI/ml.).

Si una biopelícula se ha adherido, los resultados del análisis deben tratarse con precaución (ver 1.1.8). Los recuentos bacterianos caerán después de la desinfección pero pueden recuperarse poco después. Los altos niveles de endotoxina y la aparición de hongos y levaduras en el agua también indican la presencia de biopelícula. Las muestras tomadas de las superficies internas de la tubería pueden cultivarse para confirmar que se ha formado una biopelícula. Puede ser posible controlar la biopelícula con tiempos de desinfección prolongados y/o agentes de limpieza más

agresivos. Si los niveles de contaminación microbiológica permanecen altos, la causa debe determinarse y se deben sustituir los componentes responsables.

Razón: Buenas prácticas de fabricación, de laboratorio y clínicas separan a los métodos de monitoreo de los de control. En este caso, el control de los niveles bacterianos es la desinfección que se lleva a cabo en intervalos regulares. El análisis microbiológico es el método de monitoreo independiente [Opinión].

1.1.6.3 Localización, frecuencia y técnicas de muestreo

Las muestras deben tomarse del sistema de distribución en el momento y el lugar que de el más alto nivel de contaminación, usando un puerto diseñado para la toma de muestras microbiológicas, y analizado dentro de 6 horas.

La contaminación microbiológica puede variar con el consumo del agua. Cuando el agua tratada se almacena, los niveles pueden ser más altos los días siguientes de no diálisis. Las muestras deben tomarse a la misma hora, que debe ser cuando se espera que los niveles estén altos.

Debe llevarse a cabo un estudio de la variación de contaminación con el tiempo para establecer el horario más adecuado para el muestreo. Puede ser necesario repetir este estudio si el sistema se modifica o si el patrón de consumo de agua cambia.

Las muestras deben tomarse desde el(los) punto(s) que se espera que tenga la mayor carga bacteriana, normalmente al final del ciclo de distribución, o en el último punto de la máquina, en un sistema de punto muerto, donde el flujo es más bajo. Si hay conexiones de punto muerto a las máquinas de diálisis, las muestras deben tomarse desde el tubo a la máquina. En esta ubicación debe instalarse un puerto de muestreo diseñado para la recolección de muestras para análisis microbiológicos (e.g. un puerto de tabique en serie que permita tomar muestras de la corriente media con una jeringa). El fabricante del puerto debe proporcionar un procedimiento validado para la toma de muestras.

Si las muestras se toman de la llave de paso, esta debe ser esterilizada con llama o desinfectarse químicamente (e.g. remojándolo con 70% de etanol u 80-90% de alcohol isopropílico y dejando evaporar el alcohol). Cuando la llave se abre, debe

correr al menos 2 litros de agua con un flujo alto antes de tomar la muestra. La muestra debe tomarse sin tocar la llave pues cualquier movimiento de la válvula puede liberar biopelícula.

Las muestras de líquido para diálisis también deben tomarse de los puertos diseñados para la recolección de muestras para análisis microbiológicos, idealmente un puerto de tabique en la línea entre la máquina y el dializador.

Para los análisis de endotoxinas, los recipientes de muestras deben estar esterilizados, libres de endotoxinas y hechos con materiales que no absorban endotoxinas. Generalmente el poliestireno no absorbe endotoxinas, mientras que el polipropileno debe evitarse. Debe buscarse asesoría sobre los recipientes, por parte del laboratorio que realizará las pruebas LAL o de los proveedores del reactivo LAL.

Idealmente, las muestras de agua deben analizar inmediatamente el índice de bacterias y endotoxinas. Si las muestras no pueden analizarse inmediatamente, deben mantenerse refrigeradas ($< 10^{\circ}\text{C}$), mas no congeladas. Cuando el análisis se retrase más de 6 horas, las condiciones de almacenamiento deben validarse. De ser necesario, las unidades de diálisis deben considerar la capacitación del personal para analizar las muestras internamente.

La prueba LAL del coágulo del gel puede llevarse a cabo relativamente fácil en una unidad de diálisis. Los proveedores del reactivo LAL usualmente proporcionarán entrenamiento en los procesos de análisis y validación. Cualquier procedimiento interno para cultivar bacterias deben validarse por un Laboratorio de Microbiología acreditado.

Razón: Es más probable que ocurra una variación en la contaminación microbiológica con consumo en sistemas con tanques de almacenamiento. Es importante establecer la variabilidad normal en los niveles para evitar la mal interpretación de los resultados [Opinión].

Las muestras tomadas de las llaves pueden tener una baja reproducibilidad. En un estudio de la EDTNA/ERCA, varias unidades midieron mayores niveles de endotoxina en muestras tomadas de llaves del circuito de distribución que en las tomadas de los puertos de tabique en los tubos a la máquina de diálisis (13). Si las muestras deben

almacenarse, deben mantenerse refrigeradas para estabilizar el nivel de bacterias. La congelación repetida puede reducir el nivel de endotoxina mensurable. Si es necesario transportar muestras en hielo seco, las condiciones de almacenamiento deben validarse [Opinión].

1.1.6.4 Técnicas para el cultivo de microorganismos transmitidos por el agua

Se debe utilizar una técnica para el cultivo que haya demostrado dar una buena recuperación de bacterias del agua purificada. Se deben monitorear periódicamente los niveles de hongos y levaduras usando una técnica apropiada.

Los niveles de bacterias en el agua y en el líquido de diálisis deben monitorearse utilizando una técnica de cultivo que haya demostrado dar una buena recuperación de bacterias del agua limpia.

La técnica general para “el análisis microbiológico de productos no estériles” descritos en la Farmacopea Europea (Sección 2.6.12) no es apropiado para el agua de diálisis. La evidencia sugiere que se debe usar un agar bajo en nutrientes, como el Agar extracto glucosa triptona o Reasoner's 2A (14-16) y que las muestras deben incubarse por lo menos 7 días a temperatura ambiente (17). Estas condiciones han demostrado dar una buena recuperación para la mayoría de las bacterias ambientales que se encuentran en el agua purificada. Algunas especies están mejor adaptadas para crecer a una temperatura más alta y/o en medios más ricos, pero el largo tiempo de incubación permitirá que la mayoría de estas crezca.

Si las regulaciones locales requieren un análisis para organismos específicos (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*) debe llevarse a cabo un análisis separado con un agar especialmente adaptado.

El volumen de inoculación debe escogerse de acuerdo con el límite permitido y el recuento esperado. Al someter a análisis los requerimientos de la FE 1167, se recomienda inocular una placa de difusión o placa de vertido con 1 a 5 ml. de agua. Si el agua está altamente contaminada puede diluirse con agua para inyección para dar un recuento. Al analizar agua ultrapura, se debe filtrar una muestra de al menos 100

ml. usando un filtro estéril de 0,2 micras. Luego, el filtro debe cultivarse usando las condiciones antes mencionadas.

El número de unidades formadoras de colonia deben contarse de manera consistente. Es suficiente la cuidadosa inspección visual bajo iluminación intensa.

La Farmacopea Europea no proporciona un límite específico para hongos y levaduras, ya que se agrupan en el recuento de aerobios viables total. El Svensks läkemedelsstandard 2001 especifica un límite de 10 CFU/ml.

Para monitorear los niveles de hongos y levaduras, normalmente se requiere un volumen de muestra grande porque estos organismos se adhieren bien a las superficies y aparecen en niveles muy bajos en el agua que corre. La muestra debe filtrarse a través de un filtro de 0,2 micras. Los hongos y levaduras necesitan más nutrientes que las bacterias y crecen mejor en un agar más rico (como el Agar Extracto de Malta o el Agar Dextrosa de Sabouraud). La incubación debe darse durante 7 días a temperatura ambiente. Puede ser interesante incubar las placas durante más tiempo ya que algunos organismos, como los hongos, pueden tomar más de 7 días en crecer. Los análisis de levaduras y hongos pueden ser menos frecuentes que los de bacterias, donde los niveles de estos organismos son consistentemente más bajos. Estos no deben aparecer en absoluto en un sistema en buen estado y rara vez se ven en cualquier sistema durante el primer año de operación.

Razón: Las comparaciones de diferentes métodos de análisis indican que la recuperación de bacterias del agua utilizada para diálisis es mayor cuando se utiliza un agar bajo en nutrientes, un largo periodo de incubación y una baja temperatura [Evidencia].

Los estándares suecos y franceses que figuran en 1.1.3, y los lineamientos de mejores prácticas de la ERA-EDTA, recomiendan hacer análisis de bacterias mediante la incubación en Agar extracto glucosa triptona (TGEA) o Reasoner's 2A a 20-22°C. El estándar sueco recomienda incubar por 5 días, los otros documentos sugieren 7 días. La incubación de 7 días es generalmente más conveniente (ya que los recuentos durante el fin de semana se pueden evitar) y da una mejor recuperación.

El método anterior debe considerarse como el estándar para el agua. Los métodos adicionales que se utilizan actualmente, e.g. Agar CLED o Agar sangre a 35-37°C por al menos 5 días, pueden ser de interés pero no deben reemplazar el estándar. Las nuevas técnicas que dan recuperación comparable o mejor con un periodo de incubación más corto deben validarse contra el método estándar [Evidencia y Opinión].

1.1.6.5 Medición de los niveles de endotoxina en el agua y el líquido de diálisis

Los niveles de endotoxina deben medirse utilizando Lisado de Amibocitos de Limulus (LAL) por el coágulo de gel, el método turbidimétrico o cromogénico, o una prueba equivalente.

Los niveles de endotoxinas bacterianas deben monitorearse usando el ensayo de Lisado de Amibocitos de Limulus (LAL), como se recomienda en la Farmacopea Europea (Sección 2.6.14). Todas las técnicas establecidas (coágulo de gel, turbidimétrico y cromogénico) para pruebas LAL pueden usarse para analizar agua para hemodiálisis. Pueden utilizarse técnicas alternativas siempre que hayan sido validadas en niveles de endotoxina de 0,25 UI/ml. o menos.

La forma más simple de ensayo LAL es el análisis de coágulo de gel, que puede realizarse en la unidad de diálisis, siempre y cuando el personal haya recibido el entrenamiento adecuado. Este da un resultado aprobado-reprobado, lo que es suficiente para analizar el agua con un nivel estable de endotoxina, pero puede hacerse semi-cuantitativo al diluir la muestra con agua libre de endotoxina.

Las pruebas LAL cinéticas (cromogénica, turbidimétrica) miden directamente la cantidad de endotoxina en cada muestra, siempre y cuando esté en el rango calibrado. Las pruebas cinéticas no se utilizan a menudo en las unidades de diálisis dado que el equipo requerido es costoso y tienen elevados costos de operación.

Se debe realizar la prueba de endotoxinas al líquido de diálisis rutinariamente para monitorear la eficacia del procedimiento de desinfección de la máquina de diálisis. Si los niveles de endotoxina en el líquido de diálisis son significativamente más altos que en el agua que alimenta la máquina, el programa de desinfección o el método

utilizado deben modificarse. Si todas las máquinas están sujetas a los mismos procedimientos, entonces una muestra representativa de máquinas puede probarse cada mes.

Las muestras del líquido de diálisis también deben analizarse si un paciente experimenta una reacción pirógena durante la diálisis. Se puede realizar una prueba de coágulo de gel en alrededor de 1 hora para esclarecer el origen de la reacción.

Cuando la prueba LAL se usa para monitorear la endotoxina en el líquido de diálisis, la muestra debe diluirse al menos 1:1 con agua libre de endotoxina para prevenir interferencia con el mecanismo de coagulación debido al bicarbonato (13). Tenga en cuenta que la prueba LAL funciona en un intervalo de pH limitado, de manera que no puede utilizarse para analizar el componente ácido del líquido de diálisis.

Razón: Desde un punto de vista clínico, es más importante analizar endotoxinas que bacterias en el agua y el líquido de diálisis, ya que las bacterias no pasan a través de una membrana intacta del dializador. Aún existe controversia sobre el paso transmembrana de las sustancias derivadas de bacterias, pero las endotoxinas bacterianas más pequeñas han demostrado atravesar todos los tipos de membrana (2, 18-21). Las membranas hidrofobas de alto flujo (como la polisulfona) pueden absorber endotoxinas de bajo peso molecular (22), pero la zona de retrofiltración, que generalmente ocurre en dializadores de alto flujo, permite que estas moléculas pasen a la sangre en caso de que haya algún daño en la membrana [Evidencia].

El ensayo LAL es el método recomendado por la Farmacopea Europea para el análisis de endotoxina y es ampliamente utilizado para analizar productos no pirógenos en la industria farmacéutica. Sin embargo, el personal debe ser consciente de que el ensayo de LAL no detectará todas las sustancias pirógenas derivadas de las bacterias (7, 23).

1.1.7 Medida de resultado

La implementación de este lineamiento debe auditarse a lo largo del tiempo con la revisión del registro de recuentos bacterianos y las mediciones de endotoxina. El registro debe mostrar fechas de análisis planificadas, fechas efectivas de análisis y los

resultados obtenidos. El seguimiento al programa de desinfección también debe auditarse.

Si las mediciones de rutina de temperatura corporal de pre y post diálisis y/o los marcadores de inflamación, como la Proteína C reactiva (PCR), están disponibles para grupos de pacientes no seleccionados, estos deben auditarse periódicamente para identificar tendencias que puedan estar relacionadas con la calidad del agua. Las mediciones no rutinarias, y las mediciones hechas solamente en pacientes seleccionados (en riesgo) no deben usarse para este propósito.

La unidad de diálisis debe tener procedimientos documentados que entren en vigor cuando se excedan los límites de contaminación de la Farmacopea Europea (o local). Los lineamientos de mejores prácticas de la ERA-EDTA establecen que los procedimientos deben incluir el cierre temporal de la unidad de diálisis cuando se excedan los límites seguros de contaminantes. El contenido de estos procedimientos debe revisarse regularmente. La habilidad del personal para implementar los procedimientos de manera efectiva también deben revisarse.

1.1.8 Referencias

1. Nystrand R. **Endotoxin and "on line" production of substitution fluid in haemodiafiltration and haemofiltration.** EDTNA/ERCA Journal 2002; Jul; 28 (3).

El Dr. Nystrand describe cómo los niveles de endotoxina son controlados y monitoreados en el líquido de sustitución. También presenta un método simple para calcular los niveles de endotoxina permitidos, basado en estándares farmacéuticos, el tamaño del paciente y el modo de tratamiento.

2. Mion CM, Canaud B, Garred LJ, Stec F, Nguyen QV. **Sterile and pyrogen-free bicarbonate dialysate: a necessity for hemodialysis today.** Advanced Nephrology 1990; 19: 275-314.

Aunque un poco anticuado, este visionario artículo proporciona un excelente panorama de los argumentos para usar esterilización en frío para producir líquido de diálisis libre de pirógeno. Son particularmente interesantes las secciones que describen

la formación de metabolitos y productos de degradación de diferentes tipos de organismos y la transferencia de estas toxinas a la sangre.

3. Brunet P, Berland Y. **Water quality and complications of haemodialysis.** Nephrology, Dialysis and Transplantation 2000; 15: 578-580.

Una breve revisión de las complicaciones clínicas de la exposición a la contaminación microbiológica, incluyendo amilosis, aterosclerosis y malnutrición de las que los autores concluyen que el nivel de bacterias y endotoxina en el líquido de diálisis debe ser < 100 CFU/L. y <0,01 UE/ml.

4. Bonnie-Schorn E, Grassmann A, Uhlenbusch-Körwer I, Weber C, Vienken J. **Clinical consequences of microbial contamination.** In "Water Quality in Haemodialysis", Lengerich: Pabst Science Publishers 1998; 69-79.

Esta visión general de las consecuencias clínicas de la contaminación microbiológica del agua de diálisis y del líquido de diálisis hace parte de un excelente libro de texto para técnicos y otros miembros del personal del cuidado renal.

5. Lonnemann G. **Should ultra-pure dialysate be mandatory?** Nephrology, Dialysis and Transplantation 2000; 15 (1): 55-59.

El Dr. Lonnemann describe los efectos agudos y de largo plazo de una hemodiálisis con líquido de diálisis contaminado. Recomendando mantener los niveles bacterianos en menos de 100 CFU/ml. en líquido de diálisis y menciona la necesidad de unos lineamientos para el muestreo y cultivo del líquido de diálisis. El artículo concluye que "el uso de líquido de diálisis libre de pirógeno debe volverse obligatorio hasta cuando otros estudios revelen que las enfermedades asociadas a la diálisis pueden mejorarse o prevenirse usando dializado ultrapuro".

6. Ward RA. **Ultrapure dialysate: a desirable and achievable goal for routine hemodialysis.** Seminars in Dialysis 2000; 13 (6): 378-380.

Este artículo presenta un caso usando líquido de diálisis ultrapuro y muestra que ya no existe ninguna barrera tecnológica real que evite que las unidades renales produzcan líquido ultrapuro.

7. Tsuchida K, Takemoto Y, Yamagami S, Edney H, Niwa M, Tsuchiya M, Kishimoto T, Shaldon S. **Detection of peptidoglycan and endotoxin in dialysate, using silkworm**

larvae plasma and limulus amebocyte lysate methods. Nephron 1997; 75 (4): 438-443.

Los autores utilizaron un ensayo basado en un reactivo de plasma de larva de gusano de seda (SLP) para medir muramil dipéptido (MDP), el componente biológicamente activo del peptidoglicano, que es un fragmento tanto de la pared celular bacteriana Gram positiva como de la Gram negativa. Este pirógeno no se detecta por el ensayo LAL. Los autores no solamente mostraron que el MDP está presente en algunas muestras del líquido de diálisis, sino que la producción de citoquinas fue 5-10 veces mayor cuando el MDP y la endotoxina coexistieron que cuando, tanto el MDP o ET estaban solos.

8. Schömig M, Eisenhardt A, Ritz E. **The microinflammatory state of uremia.** Blood Purification 2000; 18: 327-332.

Una revisión fácil de seguir sobre la relación entre inflamación, malnutrición y mortalidad cardiovascular. Este artículo muestra la sorprendente relación que existe entre los altos niveles de Proteína C reactiva (una medida de la inflamación) y la baja supervivencia. Los autores mencionan el agua de mala calidad como una de las causas de inflamación en pacientes de HD.

9. Lonnemann G. **Chronic inflammation in hemodialysis: the role of contaminated dialysate.** Blood Purification 2000; 18 (3): 214-223.

Una revisión de datos experimentales y clínicos recientes que sugieren que el uso de líquido de diálisis libre de pirógeno mejora el estado de la inflamación crónica, como se indica por una disminución de los niveles de plasma de Proteína C reactiva en pacientes crónicos de hemodiálisis.

10. Cappelli G, Ballestri M, Perrone S, Ciuffreda A, Inguaggiato P, Albertazzi A. **Biofilms invade nephrology: effects in hemodialysis.** Blood Purification 2000; 18 (3): 224-230.

Describe cómo las bacterias se adhieren a las superficies y se agregan a una matriz de biopolímero para formar una biopelícula que produce babaza que hace que los productos químicos para procesos de desinfección y descalcificación sean ineficaces.

11. Stickler D. **Biofilms.** Current Opinions in Microbiology 1999; Jun 2 (3): 270-275.

Una revisión de la guerra contra las biopelículas, aunque no específica para diálisis. Las bacterias en las biopelículas son 500 veces más resistentes a los antimicrobianos que las bacterias libres. El autor señala que el método más efectivo para remover biopelículas maduras es la limpieza mecánica, lo que no es generalmente una opción en una unidad de diálisis.

Otra buena revisión general sobre biopelículas, realizada por JW Costerton y PS Stewart, se publicó en Scientific American en julio de 2001. Esta incluye una imagen de bacterias intactas al interior de una biopelícula luego de 60 minutos de exposición al blanqueador. Los autores están ubicados en el "Centro para la Ingeniería de Biopelícula" en la Universidad Estatal de Montana. Las imágenes fijas y los videos de biopelículas pueden verse en el sitio web del centro (<http://www.microbelibrary.org>, seleccione "Recursos Visuales" y busque en la biblioteca usando "Biopelícula" como palabra clave)

12. Meiller TF, Depaola LG, Kelley JI, Baqui AA, Turng BF, Falkler WA. **Dental unit waterlines: biofilms, disinfection and recurrence.** Journal of American Dental Association 1999; Jan 130 (1): 65-72.

Gran parte de la literatura sobre biopelículas proviene de la comunidad dental donde es una preocupación la transmisión de patógenos microbianos desde las biopelículas a los pacientes, dentro de líneas de flotación de las unidades dentales. Estas pruebas demostraron que mientras los desinfectantes químicos reducen los niveles de microorganismos en el agua que corre, la biopelícula no se destruyó aún con tratamientos periódicos, y las líneas de flotación fueron recolonizadas rápidamente.

13. Lindley EJ, Lopot F, Harrington M, Elseviers MM. **Treatment of water for dialysis — A European survey.** EDTNA/ERCA Journal 2000; Oct 26 (4): 34-40.

Un informe sobre la encuesta del Collaborative Research Programme sobre la práctica del tratamiento de agua que incluía una prueba estándar de endotoxina. En 6 de los 9 centros, donde el sistema de distribución tenía un nivel de endotoxina >0,125 UI/ml., la muestra tomada del puerto de tabique en la tubería de la máquina fue negativa, sugiriendo que las muestras del sistema fueron contaminadas con la biopelícula de la llave de paso.

El estudio también mostró que no se podía realizar la prueba de endotoxina en el líquido de diálisis usando la prueba de coágulo del gel sin dilución, pues los electrolitos interferían con el proceso de coagulación.

14. van der Linde K, Lim BT, Rondeel JM, Antonissen LP, de Jong GM. **Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media.** Nephrology, Dialysis and Transplantation 1999; Oct 14 (10): 2433-2437.

Este estudio comparó TSA con R2A usando 229 muestras de agua y líquido de diálisis. Se incubaron placas de difusión de 0,1 ml. por 10 días de incubación a 25°C. El Reasoner's 2A dio un recuento significativamente más alto de colonias, tanto para el agua como para el líquido de diálisis, que el Agar de soja triptica.

15. Ledebø I, Nystrand R. **Defining the microbiological quality of dialysis fluid.** Artificial Organs 1999; Jan 23 (1): 37-43.

Este estudio mostró un aumento de 10-100 veces en la recuperación de bacterias del líquido de diálisis incubado en Agar extracto glucosa tristona (TGEA) a 20°C por 5 días, comparado con la incubación en Agar de soja triptica a 37°C por 2 días.

16. Harding GB, Pass T, Million C, Wright R, DeJarnette J, Klein E. **Bacterial contamination of hemodialysis center water and dialysate: are current assays adequate?** Artificial Organs 1989; Apr 13 (2): 155-159.

Comparó Agar de soja triptica, recuento en placa Agar, y Reasoner's 2A y encontró que R2A tenía una fuerte selectividad para bacterias transmitidas por el agua.

17. Pass T, Wright R, Sharp B, Harding GB. **Culture of dialysis fluids on nutrient-rich media for short periods at elevated temperatures underestimate microbial contamination.** Blood Purification 1996; 14 (2): 136-145.

Recuentos comparados a 37°C por 48 horas y a 23°C por 48, 72, 168 horas utilizando Métodos Agar Estándar, Reasoner's 2A y Agar de soja triptica rico en nutrientes. Con el tiempo, ocurrió un aumento en los recuentos de colonias para los tres fluidos. Los recuentos fueron mayores en los agares bajos en nutrientes. El día 7, el cultivo a temperatura ambiente dio hasta 104 veces el recuento para los cultivos estándar TSA de 48 horas.

18. Urena P, Herbelin A, Zingraff J, Lair M, Man NK, Descamps-Latscha B, Drueke T. **Permeability of cellulosic and non-cellulosic membranes to endotoxin subunits and cytokine production during in-vitro haemodialysis.** Nephrology, Dialysis and Transplantation 1992; 7: 16-28.

Este estudio mostró que la endotoxina radiomarcada en el líquido de diálisis se puede transferir a la sangre con membranas celulósicas, de poliacrilonitrilo y de polisulfona

19. Laude-Sharp M, Caroff M, Simard L, Pusineri C, Kazatchkine MD, Haeffner-Cavaillon N. **Induction of IL-1 during hemodialysis: transmembrane passage of intact endotoxins (LPS).** Kidney International 1990; Dec 38 (6): 1089-1094.

Este estudio demostró que las moléculas intactas de lipopolisacárido bacteriano (LPS) pueden atravesar membranas de cuprofán, AN69 y polisulfona bajo condiciones de diálisis simuladas. El 40 a 70% de las LPS, originalmente presentadas en el líquido de diálisis, fue absorbido sobre las membranas AN69 y polisulfona mientras que la membrana de cuprofán absorbió muy poco LPS.

20. Lonnemann G, Behme TC, Lenzner B, Floege J, Schulze M, Colton CK, Koch KM, Shaldon S. **Permeability of dialyzer membranes to TNF alpha-inducing substances derived from water bacteria.** Kidney International 1992; Jul 42 (1): 61-68.

Los autores utilizaron un filtrado estéril de Pseudomonas maltophilia, crecido en líquido de diálisis con bicarbonato estándar, para analizar la permeabilidad de varias membranas dializadoras (celulosa regenerada, triacetato de celulosa, poliacrilonitrilo, polisulfona y poliamida) para la inducción de sustancias bacterianas TNF-alfa. La transferencia de la actividad inducida por el TNF del lado de la sangre del dializador fue más rápida para el dializador de bajo flujo de celulosa regenerada y aún más bajo para los dializadores de polisulfona y poliamida. Los autores sugieren que las membranas sintéticas pueden absorber las sustancias derivadas de las bacterias.

21. Pereira BJ, Snodgrass BR, Hogan PJ, King AJ. **Diffusive and convective transfer of cytokine-inducing bacterial products across hemodialysis membranes.** Kidney International 1995; Feb 47 (2): 603-610.

En este estudio in-vitro el líquido de diálisis con bicarbonato, contaminado con filtrado de Pseudomonas maltophilia, se hizo circular a través del compartimiento del líquido

de diálisis de dializadores de poliamida y hemophan con sangre humana entera en el lado de la sangre. Se encontró que, debido al paso de toxinas bacterianas, la producción de citoquinas en la sangre bajaba en el dializador de alto flujo de poliamida comparado con el dializador celulósico de hemphan.

22. Weber C, Linsberger I, rafiee-Tehrani M, Falkenhagen D. **Permeability and adsorption capacity of dialysis membranes to lipid A.** Int J Artif Organs 1997; 20(3): 144-152.

Este artículo describe la controversia sobre el paso transmembrana de sustancias derivadas de bacterias y describe un estudio in-vitro en el que las membranas dializadoras fueron expuestas a endotoxinas de bajo y alto peso molecular (lípid A de E. Coli y lipopolisacáridos de Pseudomonas aeruginosa). Los resultados mostraron que las membranas de polisulfona y poliamida tienen una mayor capacidad de absorción de lípid A y LPS que las membranas celulósicas. En este estudio, se observó un buen rechazo a la endotoxina con membranas hidrofílicas y los autores atribuyeron esto a la agregación de las moléculas.

23. Bonnie-Schorn E, Grassmann A, Uhlenbusch-Körwer I, Weber C, Vienken J. **Clinical consequences of microbial contamination.** In "Water Quality in Haemodialysis", Lengerich: Pabst Science Publishers 1998; 29-34.

Una revisión de los métodos para detectar pirógenos y otras sustancias biológicamente activas. Para más detalles sobre este libro vea la referencia 4.

1.1.9 Anexo: ¿Aseguramiento de la calidad o control de calidad?

Aseguramiento de la calidad (QA), aplicada a la producción de agua para diálisis, significa diseñar y mantener la totalidad del sistema para la producción y distribución de agua purificada en un estándar que asegure que el agua cumple o excede los requerimientos de la Farmacopea Europea. Esto incluirá prevenir la proliferación de bacterias. En el contexto de aseguramiento de la calidad, los niveles de bacterias se monitorean con el único propósito de auditar.

El QA se proporciona por modernos sistemas de distribución de agua con tuberías de alta calidad, mínimo espacio muerto y desinfección térmica automatizada. Se

requiere desinfección diaria o dos veces por semana para prevenir el crecimiento de bacterias en las superficies del sistema de distribución. En la mayoría de las unidades esto solo es posible con un proceso de desinfección automatizado que es fácil de usar por parte del personal de la unidad de diálisis. La desinfección térmica es susceptible de automatización y puede dejarse sin vigilancia. También elimina la necesidad de utilizar químicos y no conlleva ningún riesgo para los pacientes, ya que todas las máquinas de diálisis tienen alarmas de alta temperatura.

Control de calidad interno (QC) implica el análisis de muestras para descubrir si cumplen con los criterios de aceptabilidad. Si una muestra no pasa la prueba de control de calidad, deben adoptarse las medidas adecuadas. Cuando se monitorea el agua para diálisis, las mediciones de control de calidad que muestren un aumento en la tendencia de los recuentos deben usarse para adaptar el programa de mantenimiento, por ejemplo, iniciando una desinfección.

La mayoría de los sistemas de distribución de agua que se utilizan actualmente no fueron diseñados con provisión para la desinfección de rutina o para la desinfección química en frío en intervalos largos. Con dichos sistemas, las bacterias proliferan y se necesitan las pruebas de control de calidad para comprobar que la calidad del agua es aceptable. Cuando la contaminación excede los límites permitidos, las bacterias deben destruirse. Los procesos de desinfección requeridos consumen mucho tiempo (y tienen que llevarse a cabo fuera de las horas normales de operación) y no están exentas de riesgo para el personal y los pacientes.

Estos sistemas son difíciles de mantener limpios pues la biopelícula bacteriana puede acumularse durante el intervalo entre desinfecciones, y porque el desinfectante no puede penetrar la biopelícula y destruir las bacterias que están profundamente adheridas. También son muy difíciles de monitorear eficazmente porque los niveles de bacterias, obtenidos mediante el cultivo de los organismos viables en una muestra de mitad de la corriente, dan una indicación muy limitada del número de bacterias en el sistema.

Incluso con las mejores técnicas de incubación, habrán algunas bacterias que no crecen y algunas unidades formadoras de colonia que contienen más de un organismo

viable. Incluso si la técnica de cultivo puede recuperar todos los organismos en el agua que corre, no puede mostrar en qué medida el sistema de distribución se coloniza. Para entender esto, es necesario hacerse una idea de la vida de los microorganismos y la difícil tarea del microbiólogo.

Los nutrientes son principalmente moléculas orgánicas con cargas eléctricas que son atraídas a las superficies. Las bacterias tratarán de adherirse a las superficies para estar donde está la comida – las que se caigan son las perdedoras. Las especies que se adhieren bien, raramente se verán en el agua que corre. Los trozos de biopelícula que se despegan contendrán muchas células, pero aparecerán como “1 CFU”. Así que el microbiólogo que realice las pruebas de control de calidad únicamente ve las colonias formadas de los trozos de biopelícula que se han desprendido de la superficie que crecerán en sus condiciones de cultivo. Esta es una pequeña fracción (tal vez 1/100000) del número real en el sistema.

El control de calidad interno puede usarse para mantener el nivel de contaminación microbiológica medido por debajo de los límites FE que se basa en la capacidad del personal para mantener el crecimiento de bacterias bajo control. Durante la vida útil de un sistema esto se volverá inevitablemente más difícil. Con el enfoque de control de calidad, no se acumula biopelícula resistente, así que no hay razón para que el sistema no continúe produciendo agua de alta calidad, siempre y cuando se siga con el programa de mantenimiento.

1.1.10 Agradecimientos

Este documento fue elaborado por el Research Borrada y el Technicians Special Interest Group de la EDTNA/ERCA con asesoría del Dr. Rolf Nystrand, asesor de microbiología para EDTNA/ERCA.

Un panel de expertos, incluyendo representantes de cuerpos industriales y regulatorios, al igual que personal técnico y clínico de las unidades de diálisis en Europa y Norteamérica, aportaron comentarios y críticas mientras el documento pasó por tres revisiones durante 2000-01.

EDTNA/ERCA agradece a todos los participantes por su ayuda en la elaboración de un documento que ayudará a nuestros miembros a mejorar la calidad de la atención que proporcionan a los pacientes de diálisis alrededor del mundo, especialmente a:

Matthew J. Arduino, Sección de Microbiología Ambiental y Aplicada, Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, EE.UU; **Bernard Canaud**, Departamento de Nefrología, Hôpital Lapeyronie, Montpellier, Francia, Presidente electo de la Sociedad Francesa de Diálisis y miembro experto de AFSAPS en nombre de la ***Asociación Renal Europea/Asociación Europea de Diálisis y Trasplantes***; **Jim Cooper**, Charles River Endosafe, Charleston, EE.UU; **Jean-Yves De Vos**, Werken Glorieux, Ronse, Bélgica; **David J Evans**, Fresenius Medical Care GmbH, Huthwaite, Reino Unido; **LeRoy J Fischbach**, Minntech Corporation, Minneapolis, EE.UU y Copresidente* del Comité de Enfermedad Renal y Desintoxicación de **AAMI**; **Alois Gorke**, Kreiskrankenhaus, Murnau, Alemania; **Roger Greenwood**, Unidad Renal, Hospital de Lister, Stevenage, Reino Unido; **Maurice Harrington**, Unidad Renal, Hope Hospital, Salford, Reino Unido; **Dan Jonsson**, Gambro, Lund, Suecia; **Stephan Krietemayer**, Lauer Membran Wassertechnik, Alemania; **Elizabeth Lindley**, Departamento de Medicina Renal, Hospital Universitario de St James, Leeds, Reino Unido; **Franta Lopot**, Departamento de Medicina Interna, Charles University Medical School, Praga, República Checa; **Thomas Ludewig**, TÜV Product Service, Munich, Alemania; **Ian Morgan**, Unidad Renal, Hospital de King's College, Londres, Reino Unido; **Rolf Nystrand**, Bio-TeQ Nystrand Consulting, Malmö, Suecia; **Hans Polaschegg**, Consultor de Dispositivos Médicos, Köstenberg, Austria; **Bernd Stegmayr**, División de Nefrología, Norrlands Universitets Sjukhus, Umeå Suecia en nombre de la ***Sociedad Europea de Órganos Artificiales***; **André Stragier**, Clinique Saint-Luc, Bruselas, Bélgica; **James Tattersall**, Basildon District Hospital, Reino Unido; **Hans Träger**, Wemer GmbH, Leverkusen, Alemania; **Richard A. Ward**, Universidad de Louisville, Kentucky, EE.UU, y Presidente* del Grupo de Trabajo de Agua para Hemodiálisis de **AAMI**

* La información de Lee Fischbach y Ward Dick estaba en su función como individuos y no debe verse como representante de las opiniones de AAMI.

SBP\SBP\ID-236125\WPC16577

ENDOSAFE TIMES



IN THIS ISSUE:

- Perspective

- PTS in Space
 - Introduction
 - Planetary Protection
 - Life Detection

- Laboratory Notebook
 - Endotoxin and Storage Containers
 - Methods
 - Results
 - Conclusions

- LAL Pointers

- What's New

PERSPECTIVE

Last year Charles River Laboratories introduced a revolutionary new platform for LAL testing, the Endosafe®-PTS. This new Portable Test System (PTS) represents a radical departure from traditional LAL testing methodologies. It is designed to be an accurate, sensitive and rapid LAL test that is also very user friendly. PTS has provided customers with real-time data for point-of-use analyses. While we are confident and thrilled that this new platform will greatly facilitate LAL testing in both pharmaceutical and non-pharmaceutical laboratory settings, our collaboration with NASA has been most exciting. NASA is investigating PTS as a means of augmenting their Planetary Protection Program. This program assesses the microbial contamination of space craft and space craft assembly areas. PTS is also being considered as an on-board component of life detection instrumentation for future spaceflight missions to look for evidence of life on other planets in our solar system. We are taking LAL where it's never gone before.

The Laboratory Notebook section of this issue of the Endosafe Times also presents a summary of a study our Technical Service department performed that assessed the stability of purified endotoxins (CSE) in a variety of containers. The type of containers used to prepare and store CSE dilutions can have a profound effect on LAL activity. As such, the type of glass or plastic can be a source of LAL assay interference.

PTS IN SPACE

INTRODUCTION

Whether one is concerned with collection of data to support spacecraft microbial contamination, or life detection, major desirable criteria include reagent systems that are accurate and sensitive. The ability to report data near the point of collection and in near real-time is also highly desirable. PTS satisfies these criteria. The polystyrene cartridge is loaded with a licensed LAL reagent and endotoxin controls. The LAL enzyme system, with its inherent amplification, is unquestionably the most sensitive means of detecting lipopolysaccharides from Gram negative bacteria. Our ability to control the Factor C or Factor G activation



1.877.CRIVER.1 • www.criver.com



A technician swabs the surface of spacecraft hardware for LAL testing.

pathway allows us to render LAL specificity towards Gram negative bacteria or fungi. Other rapid microbiological and biochemical tests will be available in the future. That PTS represents a truly miniaturized LAL instrument capable of performing kinetic spectrophotometric analyses for microbial detection in a compact "microfluidic" chamber is advantageous to NASA for obvious reasons.

PLANETARY PROTECTION

As with most pharmaceutical bioburden testing, the current approved NASA Standard Assay as stipulated in the NASA Standard Procedure for The Microbiological Examination of Space Hardware (NHB 5340.1C) requires three days to determine the microbiological bioburden. Utilizing the PTS LAL system, we were to determine if an LAL assay could yield useful information to enable near real-time decisions during space craft assembly. Swabbing methods mimic the NASA Standard Procedure with the cotton swab replaced with ultra clean polyester (Texwipe). Table 1 shows data from representative samples taken at Kennedy Space Center, Florida. A 25 cm² area was swabbed and the swab extracted with ultra clean water. Aliquots of each sample were analyzed by LAL with results expressed as EU/ml or plated on TSA plates and allowed to grow in an incubator at 37 degrees C for three days. Any organisms that grew on the plate were Gram stained and classified as Gram positive, Gram negative or mold.

LIFE DETECTION

NASA's commitment to an Exobiology / Astrobiology Program supports research in topics related to the detection of life in the universe and to the characterization of prebiotic organic chemistry. The prime mission of the Viking landers in 1976 was to search for life. In 1996, discovery of possible evidence for past life in Martian meteorite ALH84001 (McKay, et al., 1996) gave new impetus to the search for life on Mars and the restructuring of the Mars robotic program that ensued had a strong and ultimate goal of searching for life.

Sample	CFU / plate	LAL EU/ml	Gram stain
Floor by airlock	1	0.007	1 mold
Wall by airlock	0	< 0.005	NA
Floor (center)	1	0.12	1 Gram +
Wall vent	8	9.73	2 Gram - 3 Gram + 1 mold
Metal dolly	14	4.44	1Gram - 1Gram +

Table 1. Comparison of samples taken at KSC assembly area and analyzed by LAL or conventional microbiology.

A theoretical test of LAL sensitivity with mineral samples was carried out by testing pure silica which had been cleaned by exposure to dry heat (500 degrees C, 12 hours) and subsequently spiked with known concentrations of bacteria. Stainless steel tubes were first cleaned by the same dry heat, then inoculated with 10⁷ cells. Clean silica was added and mixed for one hour. Contaminated silica was extracted with ultra pure water. The limit of detection was shown to be 10⁻¹³ g/g. The results of that study are

Sample	Weight (g)	EU/ml	LPS(ng)	LPS/g sample
49	0.316	0.69	0.031	9.93E-11
53	0.336	6.0	0.272	8.10E-10
54	0.349	6.8	0.309	8.86E-10
negative	0.320	<0.01	<0.0005	<1.42E-12
negative	0.352	<0.01	<0.0005	<1.29E-12
negative	0.343	<0.01	<0.0005	<1.33E-12

Table 2. Caculated LAL values for silica samples exposed to bacterial contamination.

shown in Table 2. Samples # 49, 53 and 54 all reached onset time in less than 17 minutes and had calculated values shown. Negatives received no bacterial contamination and showed no LAL signal.

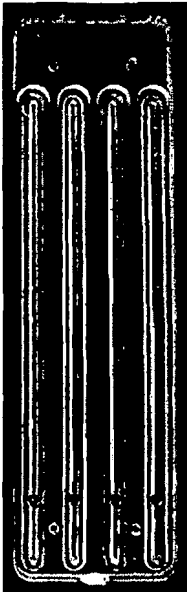
A team has been assembled to design and construct instrumentation to detect multiple biological signatures of life on other planetary bodies, including amino acids, nucleotides, polycyclic aromatic hydrocarbons, alkanes, whole cells, LPS, DNA, proteins

and other organics. Evolution of the instrument concept has led to MASSE (Modular Assay for Solar System Exploration) headed by Andrew Steele of the Carnegie Institute and David McKay of the Johnson Space Center in Houston. The LAL assay module will contribute analysis of extracts for microbial cell wall materials in this system.

Extreme environments on Earth are used to test the technology of life detection that might one day be used to test for signs of microbial life on Mars and other planets. An expedition organized by Hans Amundsen of PGP Norway, was meant to test instrumentation for life detection in one of the world's most northerly hot springs. Troll springs had not been previously characterized for microbial diversity. Techniques tested were ATP luminometry, field PCR, and field LAL assay unit (PTS produced by Charles River Laboratories). The future of PTS technology is all about bringing Charles River technology close to the source of needed tests and providing near real-time results - whether that is on the production floor of a biotech company, the clinical lab of the future, extreme environments in the field or perhaps, on the surface of another world.

LABORATORY NOTEBOOK
ENDOTOXIN AND STORAGE CONTAINERS

Accessory materials can have an impact on meeting the suitability requirements for LAL testing. The effects of endotoxin incompatible pipettes, LRW, and storage containers may be as subtle as changes in reaction time for standards in quantitative testing methods or as consistent half lambda or 2 lambda end points in gel clot testing. Conversely, the effect may also be profound such as a complete failure in linearity requirements, a complete failure in the recovery of Positive Product Controls (PPCs), or quarter lambda or 4 lambda end points in gel clot testing. As such, one of the most important accessories in LAL testing is the dilution tubes used to prepare the endotoxin standards. There are a variety of glass and plastic containers available for laboratory applications; Charles River has always touted depyrogenated borosilicate test tubes as the "gold" standard.



Sample well
(25microliter)

Optical Chamber

The PTS microcuvette contains pre-dispensed reagents neccessary to run an LAL assay.



Dr. Andrew Steele of the Carnegie Institute of Washington field tests the PTS during the Arctic Mars Analogue Svalbard Expedition (AMASE).

In addition to the capacity to subject this material to validated depyrogenation processes, this Type 1 USP glass possesses excellent properties with respect to alkaline leachables. Indeed, it is used in most LVP and SVP pharmaceutical preparations. We have also found that certain plastic test tubes work very well in the LAL laboratory. Our QC and Technical Service laboratories have had excellent results when using polystyrene test tubes. Charles River has, however, recommended the avoidance of polyolefin materials (polypropylene and polyethylene). While polyolefin's materials are extraordinarily resilient to solvents and in and of themselves do not leach organics, we have always been concerned with their hydrophobic surface properties. The paucity of charged moieties on a polyolefin surface could potentially adsorb endotoxin due to the hydrophobic domains associated with Lipid A. In the following experiment, we examined the stability of a CSE preparation in a variety of glass and plastic containers.

METHODS

In this study, we used CSE lot EM31652. Stock solutions of this CSE were prepared at two concentrations. A concentration of 0.5 EU/ml was used to represent a mid-range CSE standard. A second concentration of 0.005 EU/ml was also prepared. This concentration was used to represent the practical sensitivity limit of most LAL testing laboratories. Additionally, we believed that the 0.005 EU/ml standards would exaggerate any difference between storage materials. Once prepared, aliquots from both solutions were transferred to test containers of the following compositions: (1) borosilicate glass; (2) flint glass (USP Type 2); (3) polystyrene; (4) polyethylene terephthalate glycol (PETG); and (5) polypropylene. The test tubes were assayed immediately and then held at refrigerated temperatures for one week. All LAL examination utilized a single KTA LAL lot (S3442E). All examinations were quantitative. Our results have been summarized and illustrated as Figures 1 and 2.

RESULTS

Figure 1 illustrates the relative CSE stability of the 0.5 EU/ml standards. The standard concentration stored in the borosilicate glass test tube exhibited the fastest reaction time. On the other hand, the polystyrene test tube demonstrated the most consistent response over the 7 day storage period. The activity and the apparent stability of the CSE stored in the container was also very good. The flint and polypropylene containers were, in every respect, the least suitable container types.

Figure 2 illustrates the stability of the 0.005 EU/ml CSE. As expected, this endotoxin standard presented the data with the most variability. The borosilicate test tube did produce reaction times that were slightly slower and the apparent stability began to wane at 4 days. However, the long term stability of the 0.005 EU/ml endotoxin standards in polystyrene and PETG is quite remarkable. Flint glass tubes exhibited the worst LAL activity characteristics.

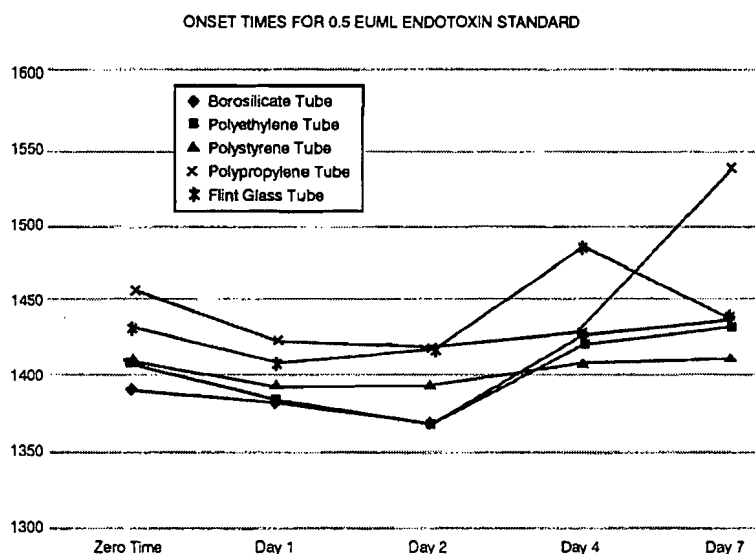


Figure 1

however, provide some general information that supported some standard LAL practices and recommendations that have been made in our industry.

The data in this study support our recommendation for the use of both borosilicate and polystyrene test tubes. Polystyrene test tubes demonstrated the most consistent endotoxin response - even after 7 days of storage. Borosilicate test tubes did begin to show some loss in endotoxin activity at 7 days. The PETG container also demonstrated data that suggests it too would be acceptable in LAL laboratories as an endotoxin storage material.

With both of the endotoxin standard concentrations illustrated in this study, the endotoxin activity measured in flint glass and polypropylene test tubes exhibited considerable variation and an apparent loss in activity over time. The data from

the flint tubes are particularly interesting in that this glass test tube (10 x 75 mm) is often used as a reaction tube for gel clot testing. However, as a reaction tube, samples or standards are mixed with LAL, a reagent which Endosafe buffers to minimize interference. Alkaline extractables that could potentially interfere with endotoxin detections are subsequently neutralized when LAL is added to the sample reaction mixture. The polypropylene and flint glass containers, however, can not be recommended for use as endotoxin dilution and/or storage tubes.

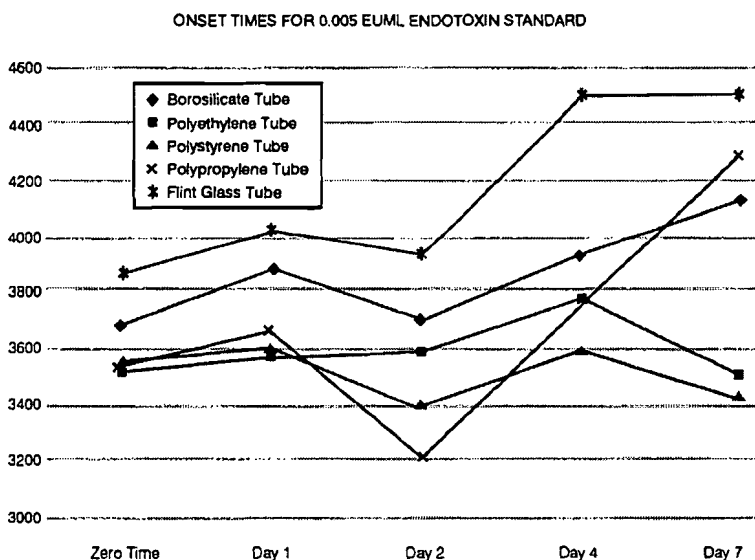


Figure 2

LAL POINTERS

The success story associated with the discovery of LAL and its replacement of the rabbit pyrogen test is nothing short of extraordinary. LAL, and the series of enzymes associated with the Gram negative bacterial endotoxin activation pathway, has enhanced pyrogen (endotoxin) testing programs for pharmaceutical companies around the world. Our new endotoxin portable test system (PTS) utilizes LAL. In fact, the formulation that we use is one that has already been licensed by the FDA for another methodology. The good news is that PTS utilizes a reagent (LAL) that has proven its utility. However, because PTS is still LAL, it is subject to all of the interferences typically associated with LAL. Therefore, the chemical composition of any given sample as well as the pH and ionic strength are some of the issues that must be considered during the development of PTS testing methods. The method development / product screening approach for PTS applications would be identical to those used for other LAL methodologies. Remember to call our Technical Services staff whenever you have questions or problems with the testing of any product with any LAL method. We can be reached at 800-762-7016.

WHAT'S NEW

NEW PRODUCT INFORMATION

Now available - Endosafe™ - Biological Indicators for monitoring gas and steam sterilization processes for health care products. Please call Technical Service at 1-800-762-7016 for more detailed product information or visit us on the web at www.criver.com.

Introducing a Sales Representative in the Mid-Atlantic region of the United States - Caralyn Andres, 856-218-7729 and a new Sales Representative in the Southeastern region of the United States - Austin Caudle, 919-332-2165.

The LAL User Group has been revived. For more information, please go to www.LALUserGroup.org.

ENDOSAFE TIMES
CHARLES RIVER LABORATORIES ENDOSAFE PRODUCTS AND SERVICES NEWSLETTER

FIRST CLASS MAIL
U.S. POSTAGE PAID
WILMINGTON, MA
PERMIT NO. 571


CHARLES RIVER
LABORATORIES
251 Ballouville Street
Wilmington, MA 01887

LOS TIEMPOS DE ENDOSAFE



EN ESTA ENTREGA:

- Perspectiva
- PTS en el Espacio
 - Introducción
 - Protección Planetaria
 - Detección de Vida
- Cuaderno de Laboratorio
 - Endotoxina y Recipientes de Almacenamiento
 - Métodos
 - Resultados
 - Conclusiones
- Indicadores de LAL
- Qué hay de nuevo

PERSPECTIVA

El año pasado Charles River Laboratories introdujo una nueva plataforma revolucionaria para las pruebas de lisado de amebocitos de límulo (LAL - *Limulus Amebocyte Lysate*, el Endosafe®-PTS. Este nuevo Sistema de Prueba Portátil (PTS - *Portable Test System*) representa una desviación radical de las metodologías de pruebas LAL tradicionales. Está diseñado para ser una prueba LAL precisa, sensible y rápida, que es además muy amigable con el usuario. PTS ha suministrado a los clientes datos en tiempo real para análisis allí donde se necesitan. Aunque estamos seguros y entusiasmados de que esta nueva plataforma facilitará enormemente las pruebas LAL en escenarios de laboratorio tanto farmacéuticos como no farmacéuticos, nuestra colaboración con la NASA ha sido muy apasionante. La NASA está investigando el PTS como un medio de ampliar su Programa de Protección Planetaria. Este programa evalúa la contaminación microbiana de la nave espacial y áreas de acoplamiento de la nave espacial. PTS se está también considerando como un componente a bordo de la instrumentación para la detección de vida en futuras misiones de vuelos espaciales con el fin de buscar evidencia de vida en otros planetas en nuestro sistema solar. Estamos llevando a LAL donde nunca había ido antes.

La sección Cuaderno de Laboratorio de esta entrega de los Tiempos de Endosafe presenta igualmente un resumen de un estudio realizado por nuestro departamento de Servicios Técnicos que evaluó la estabilidad de endotoxinas purificadas (CSE) en una variedad de recipientes. El tipo de recipientes utilizados para preparar y almacenar diluciones de CSE puede tener un profundo efecto sobre la actividad LAL. Como tal, el tipo de vidrio o plástico puede ser una fuente de interferencia del análisis LAL.

PTS EN EL ESPACIO

INTRODUCCIÓN

Si uno está interesado en la recolección de datos para comprobar la contaminación microbiana de naves espaciales, o la detección de vida, criterios importantes deseables incluyen sistemas de reactivos que sean exactos y sensibles. La capacidad comunicar datos cerca del punto de recolección y en casi tiempo real es asimismo altamente deseable. PTS satisface estos criterios. El cartucho de poliestireno se carga con un reactivo LAL autorizado y controles de endotoxina. El sistema de enzimas LAL, con su


CHARLES RIVER
 LABORATORIES

1.877.CRIVER.1 • www.criver.com



Un técnico toma una muestra con una torunda de algodón de la superficie del hardware de la nave espacial para pruebas LAL.

amplificación inherente, es incuestionablemente el medio más sensible de detectar lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas. Nuestra capacidad de controlar la vía de activación del Factor C o el Factor G nos permite trasladar la especificidad LAL a bacterias gram-negativas u hongos. Otras pruebas microbiológicas y bioquímicas rápidas estarán disponibles en el futuro. Que PTS representa un instrumento LAL verdaderamente miniaturizado, capaz de realizar análisis espectrofotométricos cinéticos para detección microbiana en una cámara "microfluida" compacta, es ventajosa para la NASA por obvias razones.

PROTECCIÓN PLANETARIA

Al igual que con la mayoría de las pruebas de carga biológica farmacéutica, el Análisis de Estándar actual, aprobado por la NASA, como se estipula en el Procedimiento Estándar de la NASA para el Examen Microbiológico de Hardware Espacial (NHB 5340.1 C), requiere tres días para determinar la carga biológica microbiológica. Utilizando el sistema LAL PTS, teníamos que determinar si un análisis LAL podría proporcionar información útil para posibilitar decisiones en casi tiempo real durante el acoplamiento de la nave espacial. Métodos de tomas de muestras con torundas de algodón imitan el Procedimiento Estándar de la NASA con la torunda de algodón reemplazada con poliéster ultra-limpio (Texwipe). Tabla 1 muestra datos de muestras representativas tomadas en el Centro Espacial de Kennedy, Florida. Se limpió con torunda de algodón un área de 25 cm² y la torunda de algodón se sometió a extracción con agua ultra-limpia. Alícuotas de cada muestra se analizaron por LAL con resultados expresados como EU/ml o se esparcieron en placas TSA y se dejaron crecer en una incubadora a 37 grados C durante tres días. Todos los organismos que crecieron en la placa se tiñeron con gram y se clasificaron como como gram-positivos, gram- negativos o moho.

DETECCIÓN DE VIDA

El compromiso de la NASA con un Programa de Exobiología/Astrobiología apoya la investigación en temas relacionados con la detección de vida en el universo y la caracterización de química orgánica prebiótica. La principal misión de las sondas Vikingo en 1976 era buscar vida. En 1996, el descubrimiento de posible evidencia de vida pasada en el meteorito marciano ALH84001 (McKay, et al., 1996) imprimió un nuevo

ímpetu a la investigación de vida en Marte, y la reestructuración del programa robótico de Marte, que siguió, tuvo un objetivo fuerte y definitivo de la búsqueda de vida. Una prueba teórica de la sensibilidad de LAL con muestras de minerales se llevó a cabo analizando sílice puro que se había limpiado por exposición a calor seco (500 grados C, 12 horas) y posteriormente enriquecido con concentraciones conocidas de bacterias. En primer

Muestra	CFU / placa	LAL EU/ml	Tinción Gram
Piso cerca de la esclusa de aire	1	0,007	1 moho
Pared cerca de la esclusa de aire	0	< 0,005	N.D.
Piso (centro)	1	0,12	1 Gram +
Ventilación de pared	8	9,73	2 Gram – 3 Gram + 1 moho
Plataforma de metal	14	4,44	1Gram – 1Gram +

Tabla 1. Comparación de muestras tomadas en el área de acoplamiento del Centro Espacial Kennedy (KSC) y analizadas por LAL o microbiología convencional.

lugar se limpiaron tubos de acero inoxidable por el mismo calor

Muestra	Peso (g)	EU/ml	LPS (ng)	LPS/g muestra
49	0,316	0,69	0,031	9,93E-11
53	0,336	6,0	0,272	8,10E-10
54	0,349	6,8	0,309	8,86E-10
negativo	0,320	<0,01	<0,0005	<1,42E-12
negativo	0,352	<0,01	<0,0005	<1,29E-12
negativo	0,343	<0,01	<0,0005	<1,33E-12

Tabla 2. Valores LAL calculados para muestras de sílice expuestas a contaminación bacteriana.

seco, luego se inocularon con 10⁷ células. Se agregó sílice limpio y se mezcló durante una hora. Se extrajo el sílice contaminado con agua ultra pura. Se comprobó que el límite de detección era de 10⁻¹³ g/g. Los resultados de ese estudio se muestran en Tabla 2. Todas las muestras # 49, 53 y 54 alcanzaron tiempos de iniciación en menos de 17 minutos y tuvieron los valores calculados

indicados. Los negativos no recibieron contaminación bacteriana y no evidenciaron señal LAL.

Se conformó un equipo para diseñar y construir instrumentación para detectar múltiples rastros biológicos de vida en otros cuerpos planetarios, incluyendo aminoácidos, nucleótidos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, alcanos, células enteras, LPS, ADN, proteínas y otros orgánicos. La evolución del concepto del instrumento llevó a MASSE (*Modular Assay for Solar System Exploration* – Análisis Modular para la Exploración del Sistema Solar), presidido por Andrew Steele del Instituto Carnegie y David McKay del Centro Espacial Johnson en Houston. El módulo de análisis LAL aportará análisis de extractos para materiales microbianos de la pared celular.

Ambientes extremos en la tierra se utilizan para probar la tecnología de detección de vida que podrían usarse algún día para detectar signos de vida microbiana en Marte y otros planetas. Una expedición, organizada por Hans Amundsen de PGP Noruega, tenía como objetivo probar la instrumentación para detección de vida en una de las termales más septentrionales del mundo. Las termales Troll no se habían caracterizado previamente en cuanto a diversidad microbiana. Las técnicas sometidas a prueba fueron luminometría ATP, PCR en campo, y la unidad de análisis LAL en campo (PTS producido por Charles River Laboratories). El futuro de la tecnología PTS es acercar la tecnología de Charles River a la fuente de las pruebas necesarias y proporcionar resultados en casi tiempo real – sea que se realice en el piso de producción de una compañía de biotecnología, el laboratorio clínico del futuro, ambientes extremos en el campo o, tal vez, en la superficie de otro mundo.

CUADERNO DE LABORATORIO

ENDOTOXINA Y RECIPIENTES DE ALMACENAMIENTO

Materiales accesorios pueden tener un impacto en cumplir los requerimientos de idoneidad para las pruebas LAL. Los efectos de pipetas incompatibles de endotoxina, LRW, y recipientes de almacenamiento pueden ser tan sutiles como cambios en el tiempo de reacción para estándares en métodos de prueba cuantitativos o como criterios de valoración consistentes de ½ lambda o 2 lambda en pruebas de coágulo de gel. Inversamente, el efecto puede ser



La microcubeta PTS contiene reactivos pre-dispensados, necesarios para ejecutar un análisis LAL.



Dr. Andrew Steele del Instituto Carnegie de Washington prueba en campo el PTS durante la Expedición Svalbard del Análogo de Marte en el Ártico (AMASE - *Arctic Mars Analogue Svalbard Expedition*).

también profundo tal como una completa falla en requerimientos de linealidad, una completa falla en la recuperación de Controles de Producto Positivos (PPCs - *Positive Product Controls*), o criterios de valoración de $\frac{1}{4}$ lambda o 4 lambda en pruebas de coágulo de gel. Como tal, uno de los accesorios más importantes en las pruebas LAL son los tubos de dilución utilizados para preparar los estándares de endotoxina. Existe una variedad de recipientes de vidrio y plástico disponibles para aplicaciones de laboratorio; Charles River ha promocionado siempre los tubos de ensayo de borosilicato despirogenados como el patrón "oro".

Además de la capacidad de someter este material a procesos validados de despirogenación, este vidrio USP tipo 1 posee excelentes propiedades con respecto a lixiviables alcalinos. Por supuesto, se usa en la mayoría de los preparados farmacéuticos LVP y SVP. Hemos descubierto igualmente que ciertos tubos de ensayo de plástico funcionan muy bien en el laboratorio LAL. Nuestros laboratorios de Control de Calidad (QC) y Servicio Técnico han tenido excelentes resultados cuando utilizan tubos de ensayo de poliestireno. No obstante Charles River ha recomendado evitar materiales de poliolefina (polipropileno y polietileno). Aunque los materiales de poliolefina son extraordinariamente resistentes a disolventes y ni en su interior ni en su exterior filtran orgánicos, hemos estado siempre interesados en sus propiedades superficiales hidrófobas. La escasez de fracciones cargadas en una superficie de poliolefina podría adsorber potencialmente endotoxina debido a los dominios hidrófobos asociados con el Lípido A. En el siguiente experimento, examinamos la estabilidad de un preparado CSE en una variedad de recipientes de vidrio y plástico.

MÉTODOS

En este estudio, utilizamos el lote CSE EM31652. Se prepararon soluciones madre de esta CSE en dos concentraciones. Una concentración de 0,5 EU/ml se usó para representar un estándar CSE de rango medio. Se preparó igualmente una segunda concentración de 0,005 EU/ml. Esta concentración se usó para representar el límite de sensibilidad práctica en la mayoría de los laboratorios de pruebas LAL. Adicionalmente, creíamos que los estándares de 0,005 EU/ml exagerarían cualquier diferencia entre los materiales de almacenamiento. Una vez preparadas, alícuotas de ambas soluciones se transfirieron a recipientes de prueba de las siguientes composiciones: (1) vidrio de borosilicato; (2) vidrio de plomo (USP tipo 2); (3) poliestireno; (4) glicol de polietileno tereftalato (PETG - *polyethylene terephthalate glycol*); y (5) polipropileno. Los tubos de ensayo se analizaron inmediatamente y luego se mantuvieron a temperaturas refrigeradas durante una semana. Todo el examen LAL utilizó un lote KTA LAL único (S3442E). Todos los exámenes fueron cuantitativos. Nuestros resultados se han resumido e ilustrados como Figuras 1 y 2.

RESULTADOS

Figura 1 ilustra la estabilidad de la CSE relativa de los estándares de 0,5 EU/ml. La concentración del estándar almacenado en el tubo de ensayo de vidrio de borosilicato exhibió el tiempo de reacción más rápido. Por otro lado, el tubo de ensayo de poliestireno demostró la respuesta más consistente durante el periodo de almacenamiento de 7 días. La actividad y la estabilidad aparente de la CSE almacenada en el recipiente fueron también muy buenas. Los recipientes de vidrio de plomo y polipropileno fueron, en todo aspecto, tipos de recipientes por lo menos apropiados.

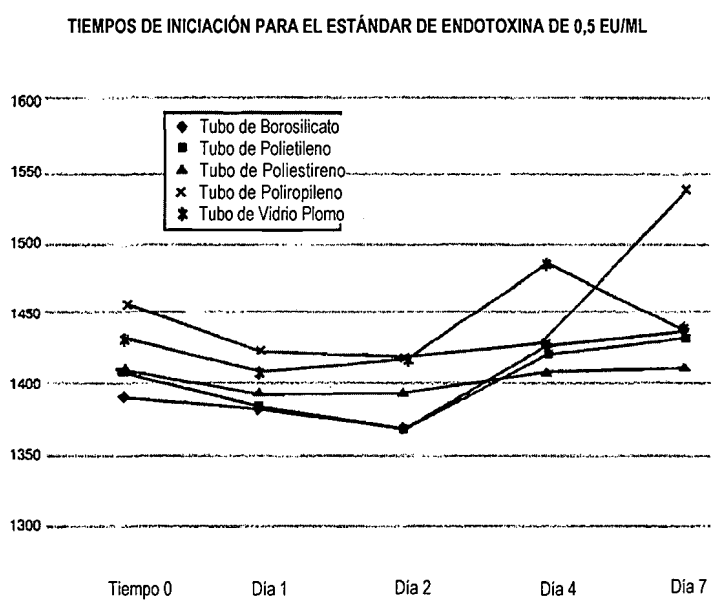


Figura 1

Figura 2 ilustra la estabilidad de la CSE de 0,005 EU/ml. Como se esperaba, este estándar de endotoxina presentó los datos con la máxima variabilidad. El tubo de ensayo de borosilicato produjo tiempos de reacción que fueron ligeramente más lentos y la estabilidad aparente empezó a decrecer en 4 días. No obstante, la estabilidad a largo plazo de los estándares de endotoxina de 0,005 EU/ml en poliestireno y PETG es bastante notoria. Los tubos de vidrio de plomo exhibieron las peores características de actividad LAL.

CONCLUSIONES

Este estudio examinó la estabilidad de las concentraciones del estándar CSE almacenado en una variedad de recipientes de ensayo (vidrio y plástico). Sin embargo, no pretendía ser totalmente

inclusivo. Los artículos de plástico (y, de hecho, los utensilios de vidrio) no se crean lo mismo. Las materias primas (resinas) y las operaciones de moldeo difieren de una fabricación a otra. Como resultado, un verdadero esfuerzo de validación requeriría un examen detallado de unos pocos proveedores (de su elección). Este estudio no pretendía hacerlo. Fue una simple y amplia evaluación de tipos de material. No obstante, este estudio proporcionó cierta información general que respaldaba algunas prácticas LAL estándar y recomendaciones que se han hecho en nuestra industria.

Los datos en este estudio respaldan nuestra recomendación para el uso de tubos de ensayo tanto de borosilicato como de poliestireno. Los tubos de ensayo de poliestireno demostraron la respuesta de endotoxina más consistente – incluso después de 7 días de almacenamiento. Los tubos de ensayo de borosilicato comenzaron a mostrar cierta pérdida en la actividad de la endotoxina a los 7 días. El recipiente de PETG mostró asimismo datos que sugieren que éste también sería aceptable en laboratorios LAL como material de almacenamiento de endotoxina.

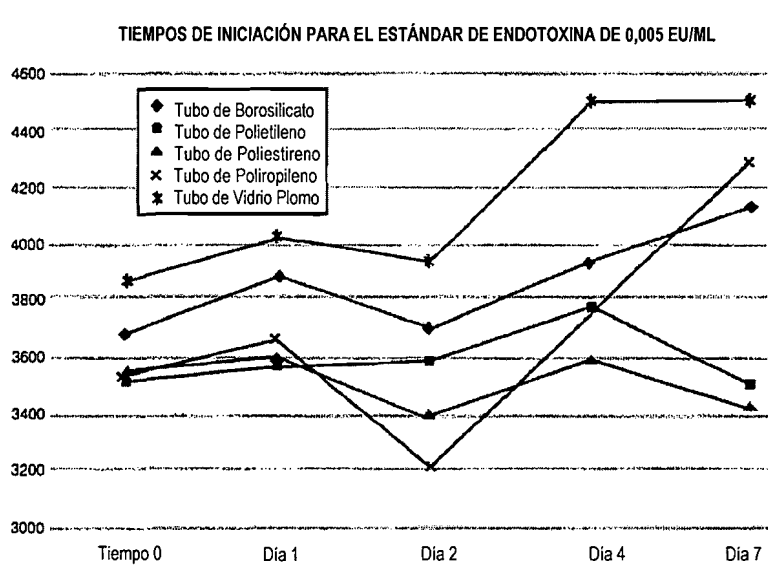


Figura 2

Con las dos concentraciones del estándar de endotoxina ilustradas en este estudio, la actividad de la endotoxina medida en los tubos de ensayo de vidrio de plomo y polipropileno exhibió una variación considerable y una aparente pérdida en actividad con el tiempo. Los datos de los tubos de vidrio de plomo son particularmente interesantes porque este tubo de ensayo de vidrio (10 x 75 mm) se usa a menudo como tubo de reacción para pruebas de coágulo de gel.

No obstante, como un tubo de reacción, muestras o estándares se mezclan con LAL, un reactivo que

Endosafe amortigua para minimizar la interferencia. Extractables alcalinos que podrían interferir potencialmente con detecciones de endotoxina se neutralizan posteriormente cuando se agrega LAL a la mezcla de reacción de la muestra de reacción. Los recipientes de polipropileno y vidrio de plomo, sin embargo, no pueden recomendarse para uso como tubos de dilución y/o almacenamiento de endotoxina.

127

INDICADORES DE LAL

La historia de éxitos asociados con el descubrimiento de LAL y su reemplazo de la prueba de pirógenos en conejos es realmente extraordinaria. LAL, y la serie de enzimas asociadas con la vía de activación de endotoxina bacteriana gram negativa, ha mejorado los programas de pruebas de pirógenos (endotoxina) para compañías farmacéuticas alrededor del mundo. Nuestro nuevo sistema de prueba portátil (PTS - *portable test system*) de endotoxina utiliza LAL. De hecho, la formulación que usamos es una que ya ha sido autorizada por la FDA en lugar de otra metodología. La buena noticia es que PTS utiliza un reactivo (LAL) que ha demostrado su utilidad. No obstante, debido a que PTS es todavía LAL, está sujeto a todas las interferencias asociadas típicamente con LAL. En consecuencia, la composición química de cualquier muestra dada, así como el pH y fuerza iónica son algunos de los problemas que tienen que considerarse durante el desarrollo de los métodos de prueba PTS. El desarrollo del método / enfoque de detección selectiva del producto para aplicaciones PTS sería idéntico a los usados para otras metodologías LAL. Recuerde llamar al personal de nuestros Servicios Técnicos siempre que tenga preguntas o problemas con las pruebas de algún producto con cualquier método LAL. Nos puede localizar en 800-762-7016.

QUÉ HAY DE NUEVO
INFORMACIÓN DE NUEVOS PRODUCTOS

Disponibles ahora - Endosafe™ - Indicadores Biológicos para monitorear procesos de esterilización con gas y vapor para productos destinados al cuidado de la salud. Sírvase llamar a Servicio Técnico al 1-800-762-7016 para una información más detallada del producto o visítenos en la web en www.criver.com.

Presentando a un Representante de Ventas en la región atlántico central de los Estados Unidos - Caralyn Andres, 856-218-7729 y a un nuevo Representante de Ventas en la región suroriental de los Estados Unidos - Austin Caudle, 919-332-2165.

El Grupo de Usuarios LAL se ha revitalizado. Para mayor información sírvase consultar www.LALUserGroup.org.


CHARLES RIVER
LABORATORIES
251 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887

FIRST CLASS MAIL
U.S. POSTAGE PAID
WILMINGTON, MA

LOS TIEMPOS DE ENDOSAFE