1. PROPÓSITO

Verificar la sensibilidad del reactivo utilizado (lisado de amebocito) para la prueba de endotoxina bacteriana, según lo declarado en su etiqueta; garantizar la ausencia de contaminación por endotoxina bacteriana en los diluyentes empleados (agua LAL libre de endotoxina o Buffer).

2. ALCANCE

Este procedimiento aplica sobre las pruebas de endotoxina bacteriana que se realicen en el Laboratorio de Microbiología a: agua de proceso, producto, materias primas y material de envase.

3. DOCUMENTOS RELACIONADOS

4. DEFINICIONES

CÓDIGO	NOMBRE DEL DOCUMENTO
PEO-AC-078	Prueba de endotoxina bacteriana en agua
PEO-AC-079	Prueba de endotoxina bacteriana en productos inyectables y materias primas

Endotoxinas: Polisacáridos de la membrana celular de las bacterias Gramnegativas, las cuáles pueden provocar reacciones pirogénicas si son administradas por vía parenteral.

5. RESPONSABILIDAD Y AUTORIDAD

Responsabilidad

Auxiliares de Microbiología: Son los responsables de llevar a cabo lo descrito en éste procedimiento.

Jefe de Microbiología: Tiene la responsabilidad de velar por el cumplimiento de éste procedimiento.

Autoridad

Jefe de Microbiología: Tiene la autoridad de realizar cualquier cambio requerido en éste procedimiento.

6. CONTENIDO

6.1 Materiales

6.1.1 Lisado de amebocitos de cangrejo (Pyrotell Limulus Amebocyte Lysate –LAL- for gel cloth method), con sensibilidad de 0.25 UE/ml.
6.1.2 Endotoxina estándar de *E. coli*
6.1.3 Agua libre de endotoxinas
6.1.4 Buffer para prueba de endotoxina.
6.1.5 Tubos de reacción despirogenizados de vidrio 10x75 mm.
6.1.6 Viales de vidrio de 10 ml
6.1.7 Pipeta automática de 100 µl
6.1.8 Pipeta automática de volumen variable 100-1000 µl.

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

6.1.9 Tips despirogenizados de 1-200 µl.
6.1.10 Tips despirogenizados de 50-1000 µl
6.1.11 Papel parafilm "M"
6.1.12 Vortex o agitador.
6.1.13 Baño de Maria a 37^0C ± 1
6.1.14 Cronómetro.
6.1.15 Gradilla para tubos de 10x75 mm
6.1.16 Mascarilla y cofia
6.1.17 Guantes de látex
6.1.18 Marcador permanente

6.2 Frecuencia

6.2.1 El control de endotoxina estándar para las pruebas de rutina deberá reconstituirse cada mes pues su duración es de no más de cuatro semanas.

6.2.2 La comprobación de la sensibilidad del lisado de amebocitos se debe llevar a cabo cuando se utiliza un lote nuevo o cuando exista un cambio en las condiciones de prueba que pueda afectar el resultado.

6.2.3 Los controles que se indican en la siguiente tabla deberán colocarse en cada corrida de prueba de endotoxina que se realice a agua de proceso, producto, material de envase o materias primas de acuerdo a la siguiente tabla y los resultados se registran en los libros correspondientes según la muestra que se ensaye:

Concentración de endotoxina/ solución a la que se agrega endotoxina	Factor de dilución	Número de repeticiones
2λ/ solución muestra	1	2
2λ/ agua para PEB	1	2
	2	2
	4	2
	8	2
Ninguna /agua para PEB ó Buffer	--	2

6.3 Procedimiento: Este procedimiento se lleva a cabo en la sala 700 del Laboratorio de análisis microbiológico.

6.3.1 Encender el baño de María.

6.3.2 Retirar de refrigeración los reactivos a utilizar. Anotar la temperatura de la refrigeradora para el almacenamiento de los reactivos en el **FO-AC-029 Control de temperatura y humedad de equipo de Aseguramiento de calidad, investigación y desarrollo y Microbiología.**

6.3.3 Colocarse cofia y guantes de látex.

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

6.3.4 Reconstitución del lisado de amebocitos

6.3.4.1 Remover la cápsula de metal del vial y el tapón de hule en forma aséptica.

6.3.4.2 Agregar el volumen necesario de agua libre de endotoxinas según fabricante -utilizando la pipeta automática de volumen variable ajustada a 1000µl y un tip nuevo.

6.3.4.3 Cubrir el vial con papel parafilm.

6.3.4.4 Agitar con vortex por 1 minuto

6.3.4.5 El lisado de amebocitos de cangrejo debe mantenerse en refrigeración (-20 a 8º C) antes de su uso y después de su reconstitución. Agitar por 1 minuto antes de utilizar.

6.3.4.6 Anotar la fecha de la reconstitución en el vial.

6.3.5 Reconstitución del estándar de endotoxina.

6.3.5.1 Verificar el certificado de análisis de estandarización contra el estándar de referencia de endotoxina para determinar el volumen de agua libre de endotoxinas a utilizar en la reconstitución, según la concentración que se desee obtener.

6.3.5.2 Remover la cápsula de metal del vial y el tapón de hule asépticamente.

6.3.5.3 Agregar el volumen de agua libre de endotoxinas determinado

6.3.5.4 Cubrir el vial con papel parafilm.

6.3.5.5 Agitar en el vortex durante 60 segundos a intervalos de 10 minutos por un período de 60 minutos (5 veces más) o bien agitar durante 60 segundos cada 5 minutos por un período de 30 minutos.

6.3.5.6 Almacenar en refrigeración (-20 a 8º C), no más de 4 semanas (no congelar). Antes de su utilización, agitarlo por 60 segundos.

6.3.5.7 Anotar la fecha de su reconstitución en la etiqueta del vial.

6.3.6 Comprobación de la sensibilidad del reactivo de lisado de amebocitos:

6.3.6.1 Deben prepararse diluciones del estándar con al menos cuatro concentraciones equivalentes a 2λ (0.5 UE/ml), λ (0.25 UE/ml), 0.5λ (0.125 UE/ml) y 0.25λ (0.0625 UE/ml).

6.3.6.2 Realizar las diluciones seriadas (múltiplos de 10: 1:10, 1:100, 1:1000, etc.) necesarias para alcanzar una concentración de endotoxina estándar de 1 UE/ml a partir del vial de endotoxina reconstituido. Identificarlas como A, B, C, etc.

6.3.6.3 Para realizar las diluciones de múltiplos de 10, ajustar la pipeta de volumen variable a 900 µl y con un tip nuevo agregar este volumen a cada uno de los tubos a utilizar.

6.3.6.4 Identificar cuatro tubos como 1, 2, 3 y 4 (en cuadruplicado, ver la siguiente tabla) y agregar con la pipeta de 100µL y un tip nuevo, 100 µl de agua libre de endotoxinas a cada uno.

Solución	**Concentración de endotoxina / solución a la que se agrega endotoxina**	**Diluyente**	**Factor de dilución**	**Concentración de endotoxina**	**Número de repeticiones**			
					1	**2**	**3**	**4**
A	2λ / Agua LAL	Agua LAL	1	2λ				
			2	1λ				

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

			4	0.5λ				
			8	0.25λ				
B	Ninguna /Agua LAL	----	----	----				

6.3.6.5 Tomar 100 µl de la dilución de endotoxina estándar concentración 1 UE/ml y agregarlos al tubo 1; agitar este tubo durante 10 segundos.

6.3.6.6 Con otro tip, extraer 100 µl del tubo 1 y agregarlos al tubo 2, repetir este procedimiento, hasta llegar al tubo 4.

6.3.6.7 Descartar 100 µl del tubo 4, luego de haberlo agitado durante 10 segundos.

6.3.6.8 Colocar un control del diluyente utilizado (agua LAL, también en cuadriplicado)

6.3.6.9 Descartar las diluciones A, B, C, etc. del numeral 6.3.6.2

6.3.6.10 Agitar el vial del reactivo de lisado de amebocito (color celeste), durante 1 minuto.

6.3.6.11 Con un nuevo tip, agregar 100 µl del vial del reactivo de lisado de amebocito a los tubos 1, 2, 3 y 4 y a los tubos del control del diluyente; agitar durante 10 segundos.

6.3.6.12 Al final del período de incubación, remover uno a uno los tubos colocados en la gradilla e invertirlos lentamente hasta 180º. Un resultado positivo se evidencia por la formación de un coágulo que aun después de invertir el tubo 180º permanece firme, cualquier otro estado de la mezcla de reacción constituye una prueba negativa. Aun cuando se ha formado un coágulo, la prueba es negativa si este se rompe o colapsa al ser invertido.

6.3.6.13 La prueba se considera válida cuando la concentración más baja de las soluciones estándar presenta un resultado negativo en todas las pruebas repetidas.

6.3.6.14 El punto final es la concentración más baja en la serie de concentraciones decrecientes de endotoxina estándar que coagula el lisado.

6.3.6.15 Determinar la media geométrica del punto final calculando la media de los logaritmos de las concentraciones en el punto final de la serie de cuatro determinaciones repetidas y calculando luego el antilogaritmo de la media, según se indica en la siguiente fórmula:

Media geométrica de la concentración en el punto final = antilogaritmo (Σe/f)

donde Σe es la suma de los logaritmos de las concentraciones en el punto final de la serie de diluciones utilizadas y f es el número de tubos de ensayo repetidos (4). La media geométrica de la concentración en el punto final es la sensibilidad media del lisado (en UE/ml). Si no es menor de 0.5λ y no es mayor de 2λ, se confirma la sensibilidad declarada de la endotoxina estándar.

6.3.7 Preparación de la solución de trabajo de estándar de endotoxina a partir del vial reconstituido de Estándar de endotoxina.

6.3.7.1 Preparar las diluciones (múltiplos de diez) necesarias para alcanzar una concentración de 1UE/ml a partir del vial de endotoxina estándar reconstituido en viales de vidrio de 10 ml de capacidad.

6.3.7.2 Tomar 5 ml de la concentración 1UE/ml y diluir con 5 ml de agua libre de endotoxina para conseguir 10 ml de concentración 0.5 UE/ml (2λ). Esta es la solución de endotoxina de trabajo para las corridas de rutina.

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

7. REVISIÓN DE ESTE DOCUMENTO

El presente documento deberá revisarse el 15/06/2025 o antes de su vencimiento si fuere necesario.

8. BIBLIOGRAFÍA

Farmacopea de los Estados Unidos de América 2012 (USP 35). <85> Prueba de endotoxinas bacterianas.

9. ARCHIVO

El presente documento original será archivado en Gestión de Calidad bajo condiciones de seguridad adecuadas, además, se emiten 2 copias controladas para el área de Aseguramiento de Calidad siendo los responsables Asistente de Documentación y Jefe de Microbiología.

10. ANEXOS

CODIGO	NOMBRE
No aplica.	

11. CONTROL DE REGISTROS

CODIGO Y NOMBRE DEL REGISTRO	RESPONSABLE DE SU ARCHIVO	MODO DE INDIZACION Y ARCHIVO	ACCESO AUTORIZADO	TIEMPO DE CONSERVACION
FO-AC-101 Registro de análisis de endotoxina bacteriana en producto terminado/ material de envase	Jefe Microbiología	En libro	Departamento de Aseguramiento de calidad	5 años
FO-AC-102 Registro de análisis de agua del sistema de tratamiento	Jefe Microbiología	En libro	Departamento de Aseguramiento de calidad	5 años

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

CODIGO Y NOMBRE DEL REGISTRO	RESPONSABLE DE SU ARCHIVO	MODO DE INDIZACION Y ARCHIVO	ACCESO AUTORIZADO	TIEMPO DE CONSERVACION
FO-AC-105 Registro de análisis de materia prima	Jefe Microbiología	En libro	Departamento de Aseguramiento de calidad	5 años
FO-AC-029 Control de temperatura y humedad de equipo de aseguramiento de calidad, Investigación y desarrollo y Microbiología.	Auxiliares de Microbiología	En leitz por fecha	Personal de laboratorio de Microbiología	3 años

12. CAMBIOS EN EL DOCUMENTO

Versión	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
1	Es la versión basada en la Farmacopea de los Estados Unidos de América 2008 (USP 31), por lo que el código y el nombre de esta referencia fue cambiado a lo largo del texto de este método de análisis. Esta versión incluye además los siguientes cambios: Cambio del nombre del método de análisis, anteriormente el nombre era: Método de análisis para prueba LAL de Endotoxina bacteriana control de calidad según USP 28 Se cambió el texto del numeral del numeral 1. Propósito y Alcance El propósito de este procedimiento es garantizar la sensibilidad del reactivo empleado (lisado de amebocito / vial celeste), lo que se conoce como control positivo; y garantizar la ausencia de contaminación de endotoxina bacteriana en los diluyentes empleados, sea agua LAL o Buffer, lo que se conoce como control negativo. Estos controles son realizados cuando se trabaja agua, materias primas y/o producto terminado, según MA.MB.02 Prueba LAL de Endotoxina Bacteriana en Agua y MA.MB.03 Prueba LAL de Endotoxina Bacteriana en Productos Inyectables Líquidos, USP 28. El principio de la prueba está basado en la reacción que se produce entre las endotoxinas bacterianas y un lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus* que producen un coágulo, después de una hora de incubación a 37^0C, según DE.84 The United States Pharmacopoeia 28 y DE.14 Associate of Cape Cod, Inc. 1994. En 2. Documentos relacionados, se agregó el MA.MB.02 Método de análisis para prueba LAL de endotoxina bacteriana en agua para inyección Se eliminó de 5. Material y equipo a utilizar las jeringas para insulina libres de pirógenos de 1 ml, en vez de ello se utiliza la pipeta de volumen variable de 100- 1000 µL. Se agregaron los siguientes materiales: 16. Mascarilla y cofia17. Guantes de látex 18. marcador permanente

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

Versión	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
	▪ En el numeral 6. Contenido 6.1 MetodologíaA, se agregó la referencia al MA.MB.02 Método de análisis para prueba LAL de endotoxina bacteriana en agua para inyección sobre cómo preparar los reactivos a utilizar en este método de análisis. Se reestructuró completamente este numeral; se dividió en tres numerales: 6.1.1 Control negativo de agua LAL 6.1.2 Comprobación de la sensibilidad del reactivo de lisado de amebocitos y preparación del control positivo para las corridas de rutina 6.1.3 Control negativo de buffer Se eliminó la Nota después del numeral 6.2.3: Es responsabilidad del departamento de Microbiología garantizar la sensibilidad del reactivo y que este no se encuentre contaminado de ninguna forma ya sea química o microbiológica; pues ello se logra al realizar este procedimiento. El contenido del numeral 6.2 Interpretación se modificó, el texto anterior era: Al final del período de incubación, remover uno a uno los tubos colocados en la gradilla e invertirlos lentamente hasta 180º. Un resultado positivo se evidencia por la formación de un coágulo que aun después de invertir el tubo 180º permanece firme, cualquier otro estado de la mezcla de reacción constituye una prueba negativa. Aun cuando se ha formado un coágulo, la prueba es negativa si este se rompe o colapsa al ser invertido. Los tubos 1, 2, 3, 4, corresponden a diferentes concentraciones de endotoxina, que sirven para verificar la sensibilidad del reactivo declarada en su etiqueta: Tubo: 1, 2, 3, 4 UE/ml: 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 Los resultados se interpretan de la siguiente manera: La sensibilidad del reactivo utilizado (0.25 UE/ml) es aceptable si los dos primeros tubos son positivos. El tercer tubo puede dar positivo en algunas ocasiones. Si los cuatro tubos dan positivo, existe algún error en la prueba. El tubo 0 es el control negativo de agua LAL, este no debe coagular. Si coagula, significa que esta se ha contaminado, y que debe cambiarse por otro vial nuevo.El tubo identificado como B es el control negativo de buffer, el cual tampoco debe coagular. Si coagula, significa que el este se ha contaminado, y que debe cambiarse por otro vial nuevo.
2	Esta versión cambia al nuevo formato y su contenido se adecúa a la nueva instalación del Laboratorio de Análisis Microbiológico, en la nueva planta de producción de Laboratorios Bonin.
3	Versión actualizada según la USP 35 (2012).
4	Se elimina la palabra Libro de los registros
5	Se cambia el código y el formato del documento según lo indicado en el PEO-SGC-001-11 Elaboración, Aprobación, Revisión y Control de documentos, con ello cambia la numeración de la versión anterior. Se cambia la ubicación en el Laboratorio para realizar la prueba descrita en éste procedimiento (se traslada a la sala 700). Se agrega el numeral 6.2 Frecuencia en donde se describe la frecuencia de reconstitución de la endotoxina estándar,

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/

Versión	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
	la frecuencia de la realización de la comprobación de la sensibilidad del lisado de amebocitos y la frecuencia y número de repeticiones en los controles (según lo especificado en la USP). En el numeral 6.3.6 Comprobación de la sensibilidad del reactivo de lisado de amebocitos se cambia el procedimiento y la forma de interpretar los resultados. Se agrega el numeral 6.3.7 Preparación de la solución de trabajo de estándar de endotoxina a partir del vial reconstituido de estándar de endotoxina.
6	En 6.1 Materiales, se corrige la medida de los tubos despirogenizados de vidrio, se corrige el nombre de los tubos plásticos, se elimina el uso de tubos plásticos y se cambia por el de viales de vidrio de 10 ml. En el numeral 6.2.3 se hace referencia a la siguiente tabla. Se elimina la tabla del numeral 6.3.6.4 y se agrega una nueva en donde se indica el número de tubos, las concentraciones de endotoxina en cada uno y el control de diluyente a utilizar., las concentraciones se integran en el numeral 6.3.6.1.
7	En la sección 1 Propósito se elimina el texto: “y descartar factores de interferencia de las muestras que puedan afectar el resultado de la prueba” debido a que no aplica en el propósito del documento. En el numeral 6.2.3 se agrega el Buffer para prueba de endotoxina en la tabla.
8	Se modifican los nombres de los reactivos en la sección de materiales, se omiten colores de etiqueta pues corresponden a un fabricante/ proveedor específico. También se modifican los nombres en el numeral 6.3 Procedimiento.

Created with Print2PDF. To remove this line, buy a license at: http://www.software602.com/