	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA EN AGUA</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-078-09</b>
		<b>Versión:</b> 09
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 1 de 8

## 1. PROPÓSITO

Garantizar que el agua que se utiliza en los procesos de fabricación de sueros parenterales, ampollas y viales cumple con las especificaciones establecidas.

Reportar oportunamente resultados fuera de especificación para que, se tomen las acciones preventivas y/o correctivas necesarias.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento aplica a las muestras de agua que se utiliza como excipiente en la producción de preparaciones parenterales en donde se debe controlar el contenido de endotoxinas.

## 3. DOCUMENTOS RELACIONADOS

CÓDIGO	NOMBRE DEL DOCUMENTO
PEO-AC-080	Control de calidad de la prueba de endotoxina bacteriana
PEO-AC-081	Control microbiológico del agua del sistema de tratamiento

## 4. DEFINICIONES

**Endotoxinas:** Polisacáridos de la membrana celular de las bacterias Gram negativas, 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 Tubos para centrífuga de poliestireno, estériles y despirogenizados con tapón de rosca de 15 ml.
- 6.1.2 Alcohol a 70% filtrado
- 6.1.3 Lisado de amebocitos de cangrejo (Limulus Amebocyte Lysate), con sensibilidad de 0.250 UE/ml.
- 6.1.4 Estándar de endotoxina de *E. coli*

Elaborado por: Jefe de Microbiología	Firma:	Fecha: 30/09/2022
Revisado por: Asistente de Documentación	Firma:	Fecha: 30/09/2022
Aprobado por: Gerente de Negocio	Firma:	Fecha: 30/09/2022

<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA EN AGUA</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-078-09</b>
		<b>Versión: 09</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 2 de 8


- 6.1.5 Agua libre de pirógenos (LRW).
- 6.1.6 Tubos de reacción despirogenizados, de vidrio de 10x15 mm.
- 6.1.7 Tips para pipeta automática despirogenizadas de 1-200 µL
- 6.1.8 Tips para pipeta automática despirogenizadas, para 50-1000 µL
- 6.1.9 Papel parafilm M
- 6.1.10 Pipeta automática de 100 µL.
- 6.1.11 Pipeta automática de volumen variable 100-1000 µL.
- 6.1.12 Vortex o agitador.
- 6.1.13 Baño de María a 37°C ±1
- 6.1.14 Cronómetro
- 6.1.15 Gradilla para tubos de 10x75 mm.
- 6.1.16 Algodón
- 6.1.17 Cofia, guantes de látex y mascarilla

## 6.2 Frecuencia

- 6.2.1 El análisis de endotoxina bacteriana se realizará diariamente al agua del retorno del loop de agua destilada ubicado en el piso técnico de la planta de producción.
- 6.2.2 Es necesario contar con el resultado de esta prueba para la preparación de sueros parenterales, de ampollas y viales; no es necesario para el inicio de producción de sueros orales. La prueba de endotoxina se realiza en los puntos de uso del loop de agua destilada según la frecuencia establecida en el **PEO-AC-081 Control microbiológico del agua del sistema de tratamiento.**

## 6.3 Toma de la muestra

- 6.3.1 Utilizando cofia, mascarilla y guantes, abrir la llave del punto de uso a muestrear, y accionar el cronómetro.
- 6.3.2 Drenar una cantidad aproximada de 5L de agua (tiempo aproximado 1 minuto).
- 6.3.3 Después de drenar dicha cantidad de agua, cerrar el punto de uso y proceder a desinfectar con alcohol al 70% filtrado, atomizando el interior de la toma. Introducir un algodón humedecido con alcohol dentro del orificio del punto uso con la ayuda de una pinza y aplicar un poco de fricción, moviendo el alcohol de adentro hacia afuera.
- 6.3.4 Abrir el punto de uso nuevamente y drenar por 30 segundos para retirar cualquier resto de alcohol.
- 6.3.5 Recolectar la muestra en un tubo para centrifuga de poliestireno, estéril y despirogenizado con tapón de rosca de 15 ml previamente identificado con el nombre de la toma o bien el número de la sala donde se ubica el punto de uso y la fecha del muestreo. Abrir el tubo cerca de la toma de agua, llenarlo aproximadamente hasta la mitad (para facilitar su homogenización con el vortex) y cerrar inmediatamente.
- 6.3.6 Cerrar el punto de uso y trasladar las muestras al Laboratorio de análisis microbiológico (sala 700) para su análisis.

	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA EN AGUA</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-078-09</b>
		<b>Versión: 09</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 3 de 8

#### 6.4 Registro de las muestras

6.4.1 Las muestras a analizar se registran en el **FO-AC-102 Análisis de agua del sistema de tratamiento**; además deben registrarse los números de lote del reactivo (lisado de amebocito), de los diluyentes y del estándar de endotoxina utilizado en la prueba.

#### 6.5 Análisis de la muestra

6.5.1 La prueba de endotoxina bacteriana se llevará a cabo en la sala 700 Laboratorio de análisis microbiológico

6.5.2 Colocarse cofia, mascarilla y guantes

6.5.3 Encender el baño de María.

6.5.4 Retirar de refrigeración los reactivos previamente reconstituidos según el **PEO-AC-080 Control de calidad de la prueba de endotoxina**. 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**.

6.5.5 Proceder a colocar los controles del análisis según lo indica el **PEO-AC-080 Control de calidad de la prueba de endotoxina bacteriana**.

6.5.6 Realizar el análisis de la muestra de la siguiente forma:

6.5.6.1 Identificar cuatro tubos: dos con número 1 y dos con número 2.

6.5.6.2 Agregar 100 µl de agua LRW (diluyente) los tubos identificados con el número 2

6.5.6.3 Agitar la muestra recolectada y agregar 100 µl de la muestra a los cuatro tubos.


6.5.6.4 Agitar con vortex por 5 segundos los dos tubos identificados con el número dos.

6.5.6.5 Tomar 100 µl de cada tubo #2 (con un tip nuevo en cada tubo) y descartar.

6.5.6.6 Agitar durante 1 minuto el vial que contiene el reactivo de lisado de amebocito.

6.5.6.7 Con un nuevo tip, agregar a los cuatro tubos, 100 µl del vial del reactivo de lisado de amebocito; luego agitar los tubos con el vortex durante 10 segundos.

6.5.6.8 Colocar los tubos en una gradilla en el baño de María e incubar sin movimiento, durante 1 hora ± 2 minutos, a 37°C ± 1°C. Anotar la temperatura del equipo en el **FO-AC-029**

	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA EN AGUA</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-078-09</b>
		<b>Versión:</b> 09
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 4 de 8

**Control de temperatura y humedad de equipo de Aseguramiento de calidad, investigación y desarrollo y Microbiología.**

6.5.6.9 Accionar el cronómetro.

6.5.6.10 Guardar nuevamente los reactivos utilizados refrigeración.

**6.6 Límite:** El límite de endotoxina bacteriana del agua para inyección es de **0.25 UE/ml**.

#### **6.7 Interpretación de resultados:**

6.7.1 Al final del período de incubación, remover uno a uno los tubos colocados en la gradilla e invertirlos lentamente hasta 180°. Un resultado positivo se evidencia por la formación de un coágulo que aun después de invertir el tubo 180° 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.

6.7.2 Los resultados de los controles deben interpretarse según lo indicado en el **PEO-AC-080 Control de calidad de la prueba de endotoxina bacteriana**.

6.7.3 Los resultados de los tubos de la muestra se interpretan de la siguiente manera:


6.7.3.1 Si ninguno de los dos tubos identificados con # 1 coagula, **significa que la muestra de agua contiene menos de 0.25 unidades de endotoxina por mililitro (<0.25 UE/ml)**.

6.7.3.2 Si ambos tubos identificados con #1 coagulan, **significa que la muestra contiene 0.25 unidades de endotoxina por mililitro (0.25 UE/ml)**.

6.7.3.3 Si además de los tubos identificados con #1 coagulan los identificados con #2, **significa que la muestra de agua contiene 0.5 unidades de endotoxina por mililitro (0.5 UE/ml)**, es decir, se encuentra fuera del límite de endotoxina bacteriana establecido.

6.7.3.4 En cualquiera de los casos anteriores cada par de tubos debe mostrar el mismo resultado para que la prueba sea válida.

Tubo 1		Tubo 2		UE/ml	Resultado
-	-	-	-	< 0.25	Cumple
+	+	-	-	0.25	Cumple
+	+	+	+	0.50	No cumple

	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA EN AGUA</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-078-09</b>
		<b>Versión:</b> 09
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 5 de 8

## 6.8 Reporte de resultados

- 6.8.1 Los resultados de la prueba de endotoxina bacteriana del agua para inyección se reportarán en el **FO-AC-061 Informe de análisis** (copia blanca) por parte del **Jefe o el Auxiliar de Microbiología** al Departamento de producción (archivar la copia verde).
- 6.8.2 Estos resultados además, se registran en el **FO-AC-102 Análisis de agua del sistema de tratamiento**.
- 6.8.3 Si el resultado de la prueba de endotoxina bacteriana excede el límite establecido, (0.25 UE/ml) se procederá a tomar nueva/s muestra/s para corroborar este resultado. Se deben realizar más diluciones seriadas dobles, en la repetición del análisis para determinar con exactitud la cantidad de endotoxina en la muestra.
- 6.8.4 Si el resultado del análisis de la/s nueva/s muestra/s sobrepasa el límite establecido, se informará nuevamente mediante el **FO-AC-061 Informe de análisis** a los departamentos de Producción y/o Mantenimiento para la determinación de la acción correctiva a tomar, dentro las cuales se encuentra la sanitización del loop de agua destilada. Se procederá a detener la producción de las líneas de sueros parenterales e inyectables; la fabricación podrá continuarse en las líneas de sueros orales, líquidos orales, semisólidos y comprimidos pues no es requisito preparar éstas formas farmacéuticas con agua para inyección.

## 7. REVISIÓN DE ESTE DOCUMENTO

El presente documento debe revisarse antes del 30/09/2024 o antes de su vencimiento si fuere necesario.

## 8. BIBLIOGRAFÍA


Farmacopea de los Estados Unidos de América 2012 (USP 40). <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

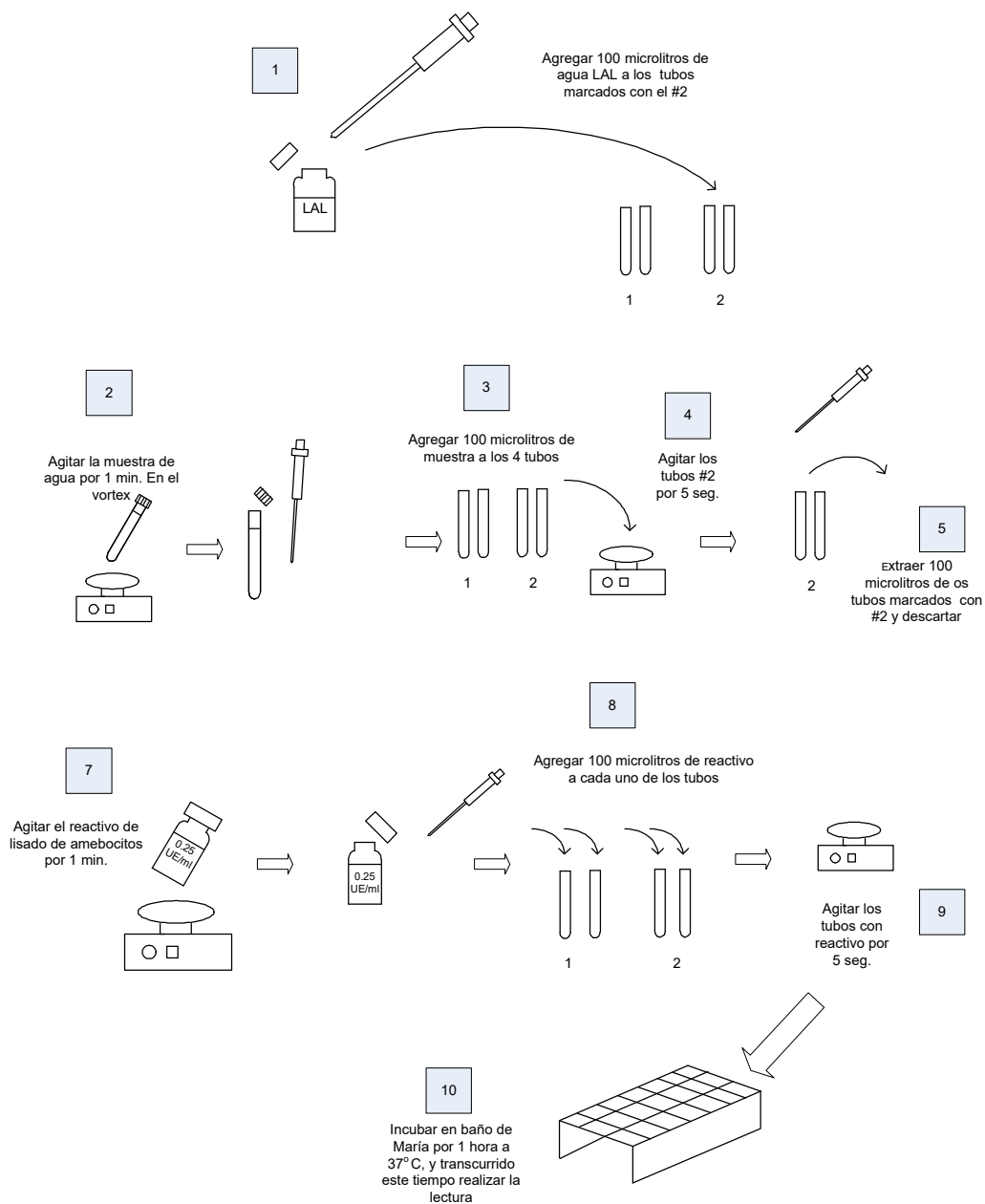
CODIGO	NOMBRE
No aplica	


<b>Laboratorios</b> <b>Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA EN AGUA</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-078-09</b>
		<b>Versión: 09</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 6 de 8

**Tabla 1** - Ubicación de los puntos de uso de agua para inyección

No. DE SALA	NOMBRE DE LA SALA
104	Lavado inyectables
113	Preparación viales
116	Preparación ampollas
209	Preparación sueros 2

**Diagrama 1** - Prueba de endotoxina bacteriana en agua para inyección



<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>		<b>Código:</b> <b>PEO-AC-078-09</b>
	<b>PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA EN AGUA</b>		<b>Versión: 09</b>
	<b>MICROBIOLOGÍA</b>		Vigencia: 30/09/2022
			Vencimiento: 30/09/2024
			Página 7 de 8


## 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-102 Análisis de agua del sistema de tratamiento	Jefe Microbiología	En libro/electrónico	Departamento de Aseguramiento de calidad	5 años
FO-AC-061 Informe de Análisis	Jefe Microbiología Supervisores de producción	Cronológicamente en Archivo	Gerencia de producción, supervisores de producción y personal de laboratorio de Microbiología	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 eran: MA.MB.02 Método de análisis para prueba LAL de endotoxina bacteriana en agua, según USP 28. Se integraron a este método de análisis los métodos: MA.MB.07 Método de análisis para informe de resultados de endotoxina bacteriana y recuento microbiológico del tratamiento de agua. MA.MB.08 Método de análisis para muestreo del agua del tratamiento agua (Límite microbiano y determinación de endotoxina bacteriana). Se agregó un diagrama en 9. Anexos sobre el procedimiento de la prueba. Cambiando la estructura completa del anterior método de análisis.
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). Se eliminó una tabla de los anexos pues la misma aplica hasta que el sistema de tratamiento de agua se encuentre validado.



<b>Laboratorios Bonin</b> 	<b>PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN</b>  <b>PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA EN AGUA</b>  <b>MICROBIOLOGÍA</b>	<b>Código:</b> <b>PEO-AC-078-09</b>
		<b>Versión: 09</b>
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 8 de 8

Versión	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
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) lo cual queda descrito en el numeral 6.5.1 Se agrega el subtítulo Registro de las muestras en donde se incluye el nuevo código y nombre del registro para éste análisis y se indica que los números de lote de reactivos y diluyentes utilizados en el análisis deben registrarse. Se modifica el numeral 6.5 Análisis de la muestra: el análisis se realiza por duplicado y se elimina una dilución. Se hace referencia al PEO-AC-080 Control de calidad de la prueba de endotoxina bacteriana para la realización de los controles.
6	Se agrega el PEO-AC-081 Control microbiológico del agua del sistema de tratamiento en 3. Documentos relacionados. En el numeral 6.2.1 se cambia el punto de uso de la sala 606 (lavado de cristalería) por el retorno del loop de agua destilada ubicado en el piso técnico. En el numeral 6.2.2 se elimina la referencia a la Tabla 1 y se cambia por la referencia al PEO-AC-081. En el numeral 6.8.4 se cambia la redacción al final del párrafo: se coloca sanitización del loop de agua destilada en lugar de sanitización del sistema de tratamiento de agua. Se modificó el código FO-CC-102 por FO-AC-102 Análisis de agua del sistema de tratamiento y el R01.PC.01 por FO-AC-206 Informe de Análisis Químico.
7	Se agrega en el numeral 6.8.4 que de no cumplir la especificación de endotoxina bacteriana el agua para inyección, se procederá detener la producción de las líneas de sueros parenterales e inyectables, no así de las líneas de sueros orales, líquidos orales, semisólidos y comprimidos.
8	Se modifica la sección de materiales, se omiten partes del nombre del reactivo y los colores de etiqueta pues los mismos corresponden a un proveedor específico. Se elimina el formato FO-AC-206 Informe de Análisis Químico, puesto que el correcto es el FO-AC-061 Informe de Análisis. Se coloca la USP 40.