



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

COMENTARIOS

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de mayo hasta el 30 de junio de 2026, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sita en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México, o al correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
Institución o empresa: _____
Teléfono: _____

Cargo: _____
Dirección: _____
Correo electrónico: _____

MONOGRAFÍA NUEVA

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>APÉNDICE. INFORMATIVO. PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS UTILIZANDO REACTIVOS RECOMBINANTES</p> <p>Las endotoxinas, también llamadas lipopolisacáridos, se encuentran en la parte externa de la membrana celular de las bacterias Gram negativas y presentan diversas actividades biológicas. Al ingresar al torrente sanguíneo, incluso en cantidades mínimas, pueden causar fiebre; en grandes cantidades, son altamente tóxicas y pueden provocar la muerte por choque endotóxico. Además, las endotoxinas pueden contaminar las preparaciones farmacéuticas durante el proceso de producción, ya que se derivan de bacterias Gram negativas ampliamente presentes en el ambiente y son difíciles de inactivar debido a su termorresistencia. Por ello, se consideran sustancias que se deben controlar para</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>garantizar la seguridad de las preparaciones farmacéuticas y dispositivos médicos, debido a su mayor pirogenicidad en comparación con otros pirógenos conocidos que podrían contaminarlas.</p>		
<p>Los siguientes métodos para la Prueba de Endotoxinas Bacterianas utilizan reactivos no derivados de animales para la prueba. Estos reactivos contienen la proteína factor C recombinante (rFC) o un reactivo en cascada recombinante (rCR) que contiene factor C y factor B recombinantes, también tiene una enzima procoagulante recombinante, por lo que es funcionalmente equivalente al lisado LAL. Los reactivos se utilizan para detectar o cuantificar endotoxinas de bacterias gramnegativas en las muestras. La prueba se realiza utilizando reactivos basados en la(s) secuencia(s) genética(s) de los factores relevantes del cangrejo herradura (<i>Limulus polyphemus</i>, <i>Tachypleus tridentatus</i> o <i>Carcinoscorpius rotundicauda</i>).</p>		
<p>Existen dos métodos para detectar la presencia de endotoxinas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Método de Fluorescencia de Punto Final, basado en el desarrollo de fluorescencia después de la activación de un complejo péptido-fluoróforo sintético, para rFC. • Método Cromogénico, cinético basado en el desarrollo de color después de la ruptura de un complejo péptido-cromóforo sintético, para rCR. 		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Factor C Recombinante</p> <p>Lipopolisacáridos (endotoxinas)</p> <pre> graph TD A[Lipopolisacáridos (endotoxinas)] --> B[Factor C Recombinante (rFC)] A --> C[Activación del rFC] C --> D[Sustrato Fluorogénico] C --> E[Producto Fluorescente] </pre>		
<p>Reactivo de Cascada Recombinante (rCR)</p> <p>Lipopolisacárido (Endotoxina)</p> <pre> graph TD A[Lipopolisacárido (Endotoxina)] --> B[Factor Recombinante C (rFC)] A --> C[rFC activado] C --> D[Factor Recombinante B (rFB)] C --> E[rFB activado] E --> F[Enzima Precoagulante Recombinante] E --> G[Enzima Coagulante Activada] G --> H[Sustrato Cromogénico] G --> I[PNA+ Cambio de Color (amarillo)] </pre>		

Característica	rFC	rCR
Enzimas	1(factor C)	3 (Factores C,B, Procoagulante)
Lectura	Punto Final	Cinético



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Método de Detección	Fluorescencia	Absorbancia/Cromogénico
Equipo	Lector de Fluorescencia	Espectrofotómetro
Cascada enzimática	Parcial	Completa (Similar a lisado natural)

Dice	Debe decir	Justificación*
Para detectar con exactitud las endotoxinas, los métodos se llevan a cabo utilizando materiales libres de endotoxina incluyendo controles de laboratorio establecidos para evitar la contaminación involuntaria por endotoxinas.		
Es responsabilidad del usuario revisar la documentación de validación inicial del proveedor y verificar que el método basado en reactivos recombinantes sea adecuado para su uso en pruebas de productos o materiales específicos. Esta verificación debe incluir: documentación con análisis específicos para confirmar que el método es adecuado para el propósito previsto en las condiciones de uso del laboratorio como el material, insumos y/o productos farmacéuticos y dispositivos médicos. El usuario debe consultar la Prueba de Factores de Interferencia que aparece a continuación.		
MATERIALES		
El material de laboratorio usado en esta prueba se debe despirogenizar con un proceso validado. El tiempo y la temperatura mínimos que se utilizan generalmente son 30 minutos a 250 °C, esto depende de la validación del ciclo. Si se utilizan materiales de laboratorio de un solo uso, como microplacas y puntas de pipeta, deben estar libres		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
de endotoxinas para que no interfieran con la prueba.		
EQUIPOS <ul style="list-style-type: none"> • Lector de Fluorescencia calibrado y calificado. • Lector de absorbancia calibrado y calificado. • Micropipeta calibrada 		
REACTIVOS Y SOLUCIONES DE PRUEBA		
Reactivos Los reactivos recombinantes: Reactivo Factor C Recombinante (rFC) o Reactivo de Cascada Recombinante (rCR). Todos los reactivos, incluido el sustrato y la solución buffer o diluyente, deben estar libres de endotoxinas.		
Soluciones de reactivos Si es necesario, preparar los reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante de los reactivos de prueba. Almacenar los reactivos de acuerdo con lo indicado por el fabricante.		
Agua para la prueba de endotoxinas bacterianas Usar agua grado inyectable o agua obtenida por otros procesos, pero que esté libre de endotoxinas para que no reaccione con el reactivo usado en el límite de detección del reactivo.		
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES		
Solución stock de endotoxina La solución stock de endotoxina se prepara a partir de un estándar de referencia de endotoxina que ha sido calibrado contra el estándar internacional de la		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
OMS vigente, por ejemplo, el estándar de referencia de Endotoxina USP. El proveedor debe entregar el certificado donde indica que se utilizó el estándar internacional antes mencionado.		
La concentración de endotoxinas se expresa en unidades de endotoxina (UE). [Nota: 1 unidad de endotoxina (UE) equivale a 1 unidad internacional (UI) de endotoxina].		
Seguir las instrucciones indicadas en la etiqueta para la preparación y el almacenamiento de la solución stock de endotoxinas.		
Soluciones estándar de endotoxina		
Después de mezclar vigorosamente la solución stock de endotoxinas, preparar diluciones seriadas necesarias para obtener la solución de endotoxina estándar utilizando agua libre de endotoxinas.		
Utilizar las diluciones inmediatamente para evitar la pérdida de actividad de la endotoxina por adsorción.		
En el mercado existen productos que incluyen soluciones para la extracción de endotoxinas en dispositivos médicos, lo cual aumenta la probabilidad de su detección. En otros casos no es necesario realizar la preparación de la curva, debido a que algunos fabricantes proporcionan las placas de Elisa preparadas con las concentraciones de la curva de endotoxina. En cualquier caso, se debe cumplir con los controles establecidos en el presente documento, así como los establecidos por los fabricantes.		
Soluciones de muestra		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Preparar las soluciones de muestra disolviendo o diluyendo el producto de prueba con agua libre de endotoxinas. Algunas sustancias o preparaciones se pueden disolver o diluir de manera más apropiada en otras soluciones acuosas. Si es necesario, ajustar el pH de la solución o dilución de prueba, de tal forma que el pH de la mezcla del reactivo y la solución de prueba se debe encontrar en el intervalo especificado por el fabricante del reactivo, generalmente de 6.0 a 8.0. La validez del control positivo del producto (solución B en la Tabla 1) puede indicar la posible necesidad de ajustar el pH de la muestra. El pH se puede ajustar con un ácido, una base o una solución buffer de acuerdo con lo recomendado por el fabricante del reactivo. Los ácidos y las bases se pueden preparar a partir de concentrados o sólidos con agua libre de endotoxinas en recipientes libres de endotoxinas. Las soluciones buffer deben estar libres de endotoxinas y factores de interferencia.</p>		
<p>DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA DILUCIÓN VÁLIDA</p>		
<p>La Máxima Dilución Válida (MDV) es la dilución máxima permitida de una muestra de prueba en la que se puede determinar el límite de endotoxina.</p>		
<p>Determinar la MDV:</p>		
<p>$MDV = (\text{límite de endotoxina} \times \text{concentración de la solución de muestra}) / (\lambda)$</p>		
<p>λ = concentración más baja del estándar de la curva con la que se cuantifica</p>		
<p>Límite de endotoxina</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
El límite de endotoxina para los medicamentos administrados por vía parenteral se define en función de la dosis.		
Calcular el límite de endotoxina de la siguiente manera: Límite de endotoxina = K / M		
Donde: K = dosis umbral pirogénica de endotoxina en humanos por kilogramo de masa corporal y es igual a 5 UE/Kg para cualquier vía de administración, excepto para intratecal, en donde K es igual a 0.2 UE/Kg. M = dosis máxima recomendada de producto en humanos por kilogramo de masa corporal.		
Cuando el producto se va a inyectar a intervalos frecuentes o de transfusión continua, M es la dosis total máxima administrada en un período de una hora.		
El límite de endotoxina para los medicamentos se especifica en UE/ml, UE/mg, UE/unidad de actividad biológica, UE/dispositivo, etc.		
<p>Concentración de la solución de muestra</p> <ul style="list-style-type: none"> • mg/mL si el límite de endotoxinas se especifica por masa (UE/mg) • Unidades/mL si el límite de endotoxinas se especifica por unidad de actividad biológica (UE/Unidad) • mL/mL si el límite de endotoxinas se especifica por volumen (UE/mL) 		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
MÉTODOS CUANTITATIVOS		
Método Fluorométrico		
Se utiliza para medir la fluorescencia [unidades relativas de fluorescencia (URF)] emitida por un sustrato fluorescente (reactivo) después de la ruptura del factor C activado por la endotoxina. Se utiliza como prueba de fluorescencia de punto final.		
La prueba de fluorescencia de punto final, se basa en la relación cuantitativa entre la concentración de endotoxina y la fluorescencia de la mezcla de reactivos al final del período de incubación. Esto se expresa, por ejemplo, como un Δ URF corregido por el blanco:		
$\Delta\text{URF} = \text{URF}_{\text{final}} - \text{URF}_{\text{inicial}}$ <p>URF_{final} = fluorescencia de la mezcla de reactivos al final del período de incubación URF_{inicial} = fluorescencia de la mezcla de reactivos al inicio del período de incubación</p>		
La prueba se lleva a cabo a la temperatura de incubación recomendada por el fabricante del reactivo de prueba (normalmente $37 \pm 1^\circ\text{C}$).		
La sensibilidad del instrumento se debe ajustar de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del reactivo de prueba para garantizar que la curva estándar esté dentro del rango del instrumento.		
Método Cromogénico		
Es un análisis cinético para medir el cromóforo liberado de un péptido cromogénico por la reacción de endotoxinas con el reactivo. El análisis cinético - cromogénico es un método para medir el tiempo		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
(tiempo inicial) necesario para alcanzar una absorbancia predeterminada de la mezcla de reacción o la velocidad de desarrollo del color. La prueba se lleva a cabo a la temperatura de incubación recomendada por el fabricante del reactivo (normalmente $37 \pm 1^\circ\text{C}$).		
Pruebas Preparatorias		
Se deben realizar pruebas preparatorias para garantizar que las técnicas fluorométrica o cromogénica sean válidas. Estas pruebas demuestran que los criterios de la curva estándar y la solución de prueba no interfieren con la prueba.		
Se requiere una validación adicional del método de prueba cuando se realizan cambios en las condiciones de análisis que puedan influir en el resultado de la prueba.		
Criterios de la curva estándar		
La prueba se debe realizar para cada lote de reactivo recombinante.		
Utilizar la solución estándar de endotoxina y a partir de esta, preparar al menos tres concentraciones mas dentro del intervalo indicado por el fabricante para generar la curva estándar. Si el intervalo deseado es mayor que $2 \log_{10}$, se deben preparar concentraciones adicionales para incluir cada incremento logarítmico de la curva estándar.		
Ejemplo:		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Punto de la Curva	UE / mL	Rango
	1.0	
	}	1 log
1	0.1	
	}	1 log
2	0.01	
	}	1 log
3	0.001	

Dice	Debe decir	Justificación*
Realizar el análisis utilizando al menos dos réplicas de cada concentración del estándar de endotoxina. Las proporciones de volumen, el tiempo de incubación, la temperatura, el pH y otras condiciones deben ser las recomendadas por el fabricante.		
El valor absoluto del coeficiente de correlación, $ r $, debe ser mayor o igual a 0.980 para el rango de las soluciones estándar de endotoxinas preparadas.		
Verificación: Prueba de Factores de Interferencia		
Como los reactivos recombinantes no son susceptibles de generar falsos positivos por la presencia del factor G, no se espera que se produzcan resultados falsos positivos debido a la activación del β -glucano. Esta posible interferencia se debe tener en cuenta cuando se compara el método con otros métodos de cuantificación de endotoxinas bacterianas.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Seleccionar una concentración de endotoxina en o cerca de la mitad de la curva estándar de endotoxina.		
Preparar las soluciones A – D como se muestra en la Tabla 1. Realizar la prueba en al menos dos réplicas de cada una de las soluciones A – D, según lo recomendado por el fabricante (volumen de la solución de prueba y mezcla de paquete de reactivos de prueba, relación de volumen de la solución de prueba con la mezcla de reactivos, tiempo de incubación, etc.).		
Tabla 1. Preparación de soluciones para la prueba de inhibición/realce		

Solución	Concentración de Endotoxina	Solución a la que se adiciona endotoxina	Número de Réplicas	Propósito
A ^a	Ninguna	Solución de muestra	No menor de 2	Detectar endotoxina endógena
B ^b	Concentración media de la curva estándar	Solución de muestra	No menor de 2	Verificar recuperación
C ^c	Al menos tres concentraciones (la concentración más baja se designa "λ")	Agua libre de endotoxinas	Cada una no menor de 2	Validar curva estándar
D ^d	Ninguna	Agua libre de endotoxinas	No menor de 2	Control negativo



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
a. Solución A: La solución de muestra se puede diluir, pero sin exceder la MDV.		
b. Solución B (control positivo del producto): La preparación que se va a analizar con la misma dilución que la solución A, que contiene endotoxina adicionada en una concentración igual o cercana a la mitad de la curva estándar.		
c. Solución C: Solución estándar de endotoxina con las concentraciones utilizadas en el método, tal como se describe en los Criterios de la curva estándar.		
d. Solución D: Agua libre de endotoxinas (control negativo).		
La prueba se considera válida si:		
1. El valor absoluto del coeficiente de correlación de la curva estándar generada utilizando la Solución C es mayor o igual a 0.980.		
2. El resultado con la Solución D, no excede el límite del valor del blanco requerido en la descripción de la mezcla de reactivos empleada o es menor que el límite de detección de endotoxinas del reactivo recombinante empleado.		
Calcular la recuperación promedio de la endotoxina adicionada restando el promedio de la concentración de endotoxina en la solución, si la hubiera (Solución A, Tabla 1), del promedio del control positivo (Solución B, Tabla 1).		
La solución de prueba se considera libre de factores de interferencia si, en las condiciones de la prueba, la concentración de la endotoxina adicionada a la solución de prueba está entre el 50		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

<p>% y el 200 %de la concentración conocida de endotoxina adicionada después de restar cualquier endotoxina detectada en la solución sin endotoxina.</p>		
<p>Cuando la recuperación de endotoxina está fuera del intervalo especificado, se considera que la solución de prueba contiene factores de interferencia. Repetir la prueba utilizando una dilución mayor, sin exceder la MDV.</p>		
<p>Existen reactivos que los fabricantes pueden recomendar para diluir soluciones con color, oleosas, etc.</p>		
<p>Las interferencias de las soluciones de muestra directa o de muestra diluida que no excedan la MVD se pueden eliminar por filtración, neutralización, diálisis o tratamiento térmico. Para establecer que el tratamiento elegido elimina eficazmente las interferencias sin pérdida de endotoxinas, repetir la prueba de factores de interferencia utilizando la Solución B y aplicando el tratamiento elegido.</p>		
<p>PROCEDIMIENTO DE PRUEBA</p>		
<p>Seguir el procedimiento descrito para la Verificación: Prueba de Factores de Interferencia.</p>		
<p>Cálculo</p>		
<p>Calcular la concentración de endotoxina de cada réplica de la Solución A utilizando la curva estándar generada por el estándar de endotoxina en la Solución C.</p>		
<p>La prueba se considera válida cuando se cumplen los tres requisitos siguientes:</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

1. Los resultados del control Solución C, cumplen con los requisitos definidos para los Criterios de la curva estándar.		
2. La recuperación de endotoxina, calculada a partir de la concentración encontrada en la Solución B después de restar la concentración de endotoxina encontrada en la Solución A, es del 50% al 200%.		
3. El resultado de control negativo (Solución D) no excede el límite del valor del blanco requerido en la descripción de la mezcla de reactivos empleada o es menor que el límite de detección de endotoxina del reactivo recombinante empleado.		
Interpretación		
La muestra analizada cumple con la prueba si la concentración media de endotoxina de las réplicas de la Solución A, después de corregir la dilución y la concentración, es menor que el límite de endotoxina para el producto.		

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

