"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 noviembre hasta el 31 de diciembre 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:		**Cargo:**	
Institución o empresa:		**Dirección:**	
Teléfono:		**Correo electrónico:**	

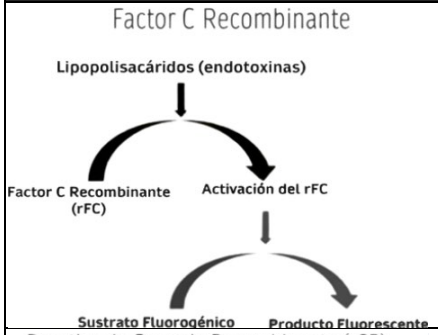
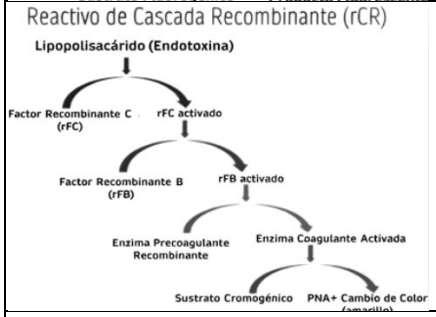
EL TEXTO EN COLOR ROJO HA SIDO MODIFICADO

Dice	Debe decir	Justificación*
MGA 0316. DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS		
Las endotoxinas también llamadas lipopolisacáridos, se encuentran en la parte externa de la membrana celular de las bacterias Gram negativas, son la causa más común de reacciones tóxicas asociadas a la contaminación de productos farmacéuticos y artículos médicos. Las endotoxinas son lipopolisacáridos cuya actividad es mayor que la de otras sustancias pirogénicas de estructura diferente.		
La prueba para determinar o cuantificar endotoxinas utiliza el lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus* o reactivos recombinantes.		
~~Existen dos métodos para esta determinación:~~		
Actualmente se cuenta con los siguientes métodos:		
Método A: Formación de un gel.		
Método B: Fotométrico, que dependiendo de la forma de cuantificación puede ser:		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
• Turbidimétrico (cinético y de punto final), basado en el desarrollo de turbiedad después de la ruptura de un sustrato endógeno. • Cromogénico (cinético y de punto final), basado en el desarrollo de color después de la ruptura del complejo sintético péptido-cromógeno.		
Método C: Reactivos recombinante.		
~~Los siguientes métodos para la Prueba de Endotoxinas Bacterianas utilizan~~ Son 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. Los reactivos se utilizan para detectar o cuantificar endotoxinas de bacterias Gram negativas en las muestras. La prueba se realiza utilizando reactivos basados en la(s) secuencia(s) genética(s) de los factores relevantes del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus, Tachypleus tridentatus o Carcinoscorpius rotundicauda*).		
Existen dos métodos que utilizan reactivos recombinantes para cuantificar la presencia de endotoxinas: • Método de Fluorescencia de Punto Final, basado en la activación del Factor C recombinante (rFC) por endotoxinas, lo que resulta en la escisión de un sustrato sintético péptido–fluoróforo y en el desarrollo de fluorescencia proporcional a la concentración de endotoxinas. • Método Cromogénico, cinético basado en el desarrollo de color después de la ruptura de un complejo péptido-cromóforo sintético, para rCR.		
A continuación, se muestra en la figura 1 el mecanismo de reacción de los dos métodos, utilizando reactivos recombinantes.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
		
		
Figura 1. Activación del Factor C recombinante utilizado en el método de fluorescencia de punto final; y la reacción obtenida utilizando el método Cromogénico.		
En la tabla *0316.1* se muestran las características y diferencias entre los reactivos recombinantes.		
Tabla 0316.1 Características de los reactivos recombinantes		

Característica	rFC	rCR
Enzimas	1(factor C)	3 (Factores C,B, Procoagulante)
Lectura	Punto Final	Cinético
Método de Detección	Fluorescencia	Absorbancia/Cromogénico
Equipo	Lector de Fluorescencia	Espectrofotómetro
Cascada enzimática	Parcial	(Similar a lisado natural)

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Se puede utilizar cualquiera de los 3 métodos mencionados. En caso de duda o controversia, la decisión final se toma basándose en el *Método A. Formación de un gel*, a menos que se indique algo diferente en la monografía del producto en análisis.		
Para detectar con exactitud la cantidad de endotoxinas, los métodos se llevan a cabo utilizando materiales libres de endotoxina, incluyendo controles de laboratorio establecidos para evitar la contaminación involuntaria.		
MATERIAL, ~~Y~~ EQUIPOS E INSTRUMENTOS • **Material estable al calor.** Debe estar libre de endotoxinas y no interferir con la prueba. Utilizar ciclos de despirogenización con calor seco ~~a 250 °C por lo menos 30 min o~~ con las condiciones establecidas durante la validación del proceso. • **Material desechable.** Cuando se utilicen microplacas, puntas para pipetas automáticas, jeringas, etc., demostrar que están libres de endotoxinas. • Micropipeta calibrada • Lector de Fluorescencia adecuado para ensayos de detección por fluorescencia. • Lector de absorbancia calibrado y calificado.		
REACTIVOS		
Nota: todas las soluciones utilizadas en la prueba deben estar libres de endotoxina bacteriana.		
• **Control estándar de endotoxina (CEE).** Preparación de endotoxina de *Escherichia coli* caracterizada y estandarizada contra una endotoxina de referencia que ha sido calibrada con respecto al estándar internacional de endotoxina de la Organización Mundial de Salud. Una Unidad Internacional (UI) de endotoxina es equivalente a una Unidad de Endotoxina (UE). En algunos casos, el fabricante puede entregar el CEE adsorbido en las placas o tubos de prueba.		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
• **Lisado de amebocitos (LAL).** El lisado de amebocitos de *Limulus* es un extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus),* preparado y caracterizado para usarse como reactivo. También puede obtenerse de *Tachypleus tridentatus.* Éste reactivo se refiere solamente al producto manufacturado de acuerdo con las regulaciones de la autoridad competente. (***Nota***: el reactivo de amebocitos de Limulus también reacciona con algunos β-glucanos. Hay disponibles Lisados de amebocitos que no reaccionan con glucanos: Se prepara removiendo del Lisado el factor G que reacciona con los glucanos o inhibiéndolo, de esta forma puede ser utilizado para la prueba de endotoxina en presencia de glucanos).		
• **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.		
• **Reactivos utilizados para neutralizar o eliminar las interferencias de las muestras.** Estos deben ser otorgados por el fabricante de los reactivos recombinantes y ser libres de endotoxinas.		
• **Agua libre de endotoxinas (ALE).** Es el diluyente de elección y no debe reaccionar con el reactivo de LAL.		
PREPARACIÓN DE REACTIVOS		
Estándar de endotoxina. **Método A y B (formación de gel y método fotométrico).** Para reconstituir y almacenar el estándar, seguir las instrucciones del fabricante. A partir de esta solución concentrada preparar las diluciones de prueba, para evitar		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
pérdida de actividad por adsorción usar~~las~~ inmediatamente ~~en el menor tiempo posible~~ a menos que las condiciones y periodos de almacenamiento se validen.		
Método C (Factor C recombinante y reactivo de cascada recombinante). 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 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 endotoxinas utilizadas en método C. 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 y recuperación 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 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.		
Lisado de amebocitos. **Método A y B (formación de gel y método fotométrico).** Reconstituir el reactivo con agua libre de endotoxina (ALE) o solución amortiguadora, siguiendo las instrucciones del fabricante. Mezclar suavemente, evitando la formación de		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
espuma. Almacenar el lisado reconstituido en refrigeración o congelación, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.		
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA **Método A y B (formación de gel y método fotométrico).** Disolver, diluir o extraer la muestra usando ALE. Algunas sustancias o preparaciones se diluyen o extraen mejor en otras soluciones acuosas. El pH de la mezcla del lisado y la solución de prueba debe estar dentro del intervalo especificado por el fabricante del lisado, usualmente entre 6.0 y 8.0, en caso necesario, ajustar el ajuste de pH de la solución de prueba, utilizar soluciones de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o la solución amortiguadora recomendada por el fabricante del reactivo de LAL.		
Método C (Factor C recombinante y reactivo de cascada recombinante). Preparar las soluciones de muestra, disolver o diluir el producto con agua libre de endotoxinas. Algunas sustancias o preparaciones se pueden disolver o diluir de manera más eficiente en otras soluciones dependiendo la naturaleza del producto. 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 316.5.*) 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.		
Dispositivos médicos (Método A, B y C). Para artículos médicos emplear de 3 a 10 muestras. Considerando el tamaño y forma de éstos enjuagar o remojar y agitar con ALE. Colectar el agua de enjuague o extracción y determinar la concentración de endotoxina por cualquiera de los		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
métodos descritos. Para dispositivos etiquetados como "catéter no pirogénico" enjuagar las paredes internas del catéter con el líquido de extracción a una temperatura de 37 ± 1.0 °C. Mantener el líquido de extracción en contacto con la zona crítica del catéter por lo menos 1 h a temperatura ambiente controlada. Si se considera apropiado, mezclar los extractos.		
DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA DILUCIÓN VÁLIDA (*MDV*) La máxima dilución válida es la dilución máxima permitida de una muestra en la que el límite de endotoxina puede determinarse. Cuando el límite de endotoxina se expresa en volumen en la monografía del producto, la *MDV* se calcula mediante la siguiente fórmula: $MDV = Límite\ de\ endotoxina / \lambda$		
Donde: *Límite de endotoxina* = Concentración máxima de endotoxina permitida en un producto, que no produce una respuesta clínica pirogénica cuando se administra a la dosis indicada. λ = Sensibilidad del lisado indicada en el marbete del reactivo, expresada en UE/mL, o la concentración más baja de la curva estándar en los ensayos cuantitativos		
Cuando el límite de endotoxina se expresa en la monografía del producto en términos de masa o unidad del principio activo, la *MDV* se calcula mediante la siguiente fórmula: $MDV = Límite\ de\ endotoxina \times C / \lambda$		
Donde: *C* = Concentración del producto en la solución de prueba o del producto reconstituido de acuerdo a las indicaciones del marbete, expresada en UE/mg o UE/Unidad de actividad biológica.		
DISPOSITIVOS MÉDICOS La máxima dilución válida para dispositivos médicos se		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
calcula dividiendo el límite de endotoxina entre la sensibilidad del reactivo de LAL utilizado: MDV = Límite de endotoxina (UE/dispositivo) / λ		
Para dispositivos médicos el límite de endotoxina no es mayor a 20.0 UE/dispositivo, excepto para dispositivos en contacto con el líquido cefalorraquídeo, en este caso el límite se considera no mayor a 2.15 UE/dispositivo.		
ESTABLECIMIENTO DE LÍMITES DE ENDOTOXINAS Cuando en la monografía correspondiente el límite de endotoxina de la muestra no está especificado, como en los medicamentos administrados por vía parenteral, se define en función de la dosis y se debe emplear la siguiente fórmula: *Límite de endotoxina = K / M*		
Donde: *K* = Dosis umbral pirogénica de endotoxina en humanos por kilogramo de peso corporal y es igual a 5 UE/kg para cualquier vía de administración, excepto para la intratecal, en donde *K* es igual a 0.2 UE/kg. *M* = Dosis máxima recomendada del producto en humanos por kilogramo de peso corporal. Cuando el producto es inyectado a intervalos frecuentes o de transfusión continua, *M* es la dosis total máxima administrada en un periodo de una hora.		
Para radiofármacos que no se administran por vía intratecal, el límite se calcula mediante la siguiente fórmula: Límite de endotoxina = 175 / V		
Donde: *V* = Dosis máxima recomendada por mililitro. Para radiofármacos que se administran por vía intratecal, el límite de endotoxina se calcula mediante la fórmula: Límite de endotoxina = 14 / V		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
Para formulaciones (por lo general productos oncológicos), que se administran por m^2 de superficie corporal, la fórmula es: *Límite de endotoxina = K / M*		
Donde: *K* = 2.5 UE/kg *M* = (dosis máxima /m^2/ hora × 1.80 m^2) / 70 kg		
Dispositivos médicos. Para dispositivos médicos el límite de endotoxina no es mayor a 20.0 UE/dispositivo excepto para dispositivos en contacto con líquido cefalorraquídeo donde el límite no es mayor a 2.15 UE/dispositivo. El límite de endotoxina para el líquido de enjuague o extracción se calcula por la siguiente fórmula: (K N) / (V)		
Donde: *K* = Cantidad de endotoxina permitida por dispositivo. *N* = Número de dispositivos evaluados. *V* = Volumen total del líquido de extracción o enjuague.		
El límite de endotoxina para los medicamentos se especifica en UE/ml, UE/mg, UE/unidad de actividad biológica, UE/dispositivo, etc.		
PRUEBAS PRELIMINARES PARA MÉTODOS A Y B La validez de los resultados de la prueba de endotoxinas por cualquiera de los métodos de formación de gel propuestos, requiere: • Verificar la sensibilidad del lisado. • Demostrar la ausencia de factores que interfieran con la prueba en la muestra, en su solución, enjuague o extracto.		
MÉTODO A. MÉTODO DE FORMACIÓN DE GEL **Verificación de la sensibilidad del lisado.** Efectuar la prueba cada vez que se utilice un nuevo lote del reactivo y/o		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
se modifiquen las condiciones experimentales. A partir del control estándar de endotoxina CEE, preparar 4 diferentes concentraciones con un factor de dilución de dos equivalentes a 2; 1; 0.5 y 0.25 λ y llevar a cabo por lo menos cuatro réplicas, incluir un control negativo (agua libre de endotoxina). En cada tubo de prueba mezclar volúmenes iguales (generalmente 0.1 mL) del reactivo de LAL y de la solución del estándar de endotoxina. Cuando se usen tubos con el reactivo de LAL liofilizado, añadir directamente la solución de prueba. Incubar la mezcla en las condiciones señaladas por el fabricante (generalmente de 37 ± 1 °C durante 60 ± 2 min), evitar vibraciones. Al finalizar el periodo de incubación, tomar cada tubo e invertirlo 180° con un movimiento suave. Considerar una prueba positiva cuando el gel permanezca integro al invertir el tubo y una prueba negativa cuando no haya formación de un gel firme.		
La prueba se considera válida si: • El agua libre de endotoxinas (control negativo) da un resultado negativo. • En la concentración más baja de CEE el resultado en todas las réplicas es negativo.		
El punto final se define como el último resultado positivo en la serie de diluciones de endotoxina.		
Cálculos. Calcular la media geométrica de las concentraciones del punto final de la siguiente manera: $M = antilog\ \Sigma\ e/f$ Donde: M = Media geométrica de la concentración del punto final. Σe = Suma de logaritmos de las concentraciones del punto		

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>final de la serie de diluciones empleadas. f = Número de réplicas.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Si el resultado de la media geométrica se encuentra entre 0.5 y 2 λ de la sensibilidad indicada en el marbete, el reactivo puede utilizarse. Véase ejemplo en tabla 0316.2.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Tabla 0316.2. Ejemplo.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>
<table>
<tr><th rowspan="2">Réplica</th><th colspan="4">Concentración de endotoxina
Sensibilidad = 0.125 UE/mL</th></tr>
<tr><th>0.25 UE/mL (2 λ)</th><th>0.125 UE/mL (1 λ)</th><th>0.0625 UE/mL (0.5 λ)</th><th>0.031 UE/mL (0.25 λ)</th></tr>
<tr><td>1</td><td>+</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td></tr>
<tr><td>2</td><td>+</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td></tr>
<tr><td>3</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>-</td></tr>
<tr><td>4</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>-</td></tr>
</table>
</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Σe = log 0.125 + log 0.125 + log 0.0625 + log 0.0625Σe = (-0.9030) + (-0.9030) + (-1.2041)+ (-1.2041)Σe/f = -4.2142 / 4 = -1.05353</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Media geométrica = Antilog (-1.05353) = 0.08839</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>La sensibilidad del reactivo se confirma ya que el resultado de la media geométrica se encuentra entre 0.5 y 2 λ.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Factores de interferencia. Son factores presentes en la muestra que pueden ocasionar resultados falsos positivos o negativos. Repetir la prueba, siempre que se presenten cambios en alguna de las condiciones que pudieran influir en el resultado de la misma como por ejemplo, la fuente del reactivo, las condiciones de fabricación del producto y/o condiciones experimentales, que incidan en los resultados de la prueba.
Preparar las soluciones A, B, C y D como se indica en la tabla 0316.3. La solución de prueba se utiliza en una dilución menor a su MDV que no contenga endotoxina detectable. Llevar a cabo la prueba de acuerdo al procedimiento descrito en la verificación de la sensibilidad del lisado, y diluir la endotoxina en solución de prueba o en agua libre de endotoxinas.</td><td></td><td></td></tr>
</table>

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>Tabla 0316.3. Preparación de soluciones para la prueba de interferencia en el método de formación de gel.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>
<table>
<tr><th></th><th>Solución</th><th>Concentración final de endotoxina</th><th>Réplicas</th></tr>
<tr><td>A</td><td>Solución de prueba</td><td>--------</td><td>4</td></tr>
<tr><td>B</td><td>Solución de prueba</td><td>2 λ</td><td>4</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>1 λ</td><td>4</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>0.5 λ</td><td>4</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>0.25 λ</td><td>4</td></tr>
<tr><td>C</td><td>Agua libre de endotoxinas</td><td>2 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>1 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>0.5 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>0.25 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td>D</td><td>Agua libre de endotoxinas</td><td>--------</td><td>2</td></tr>
</table>
</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Solución A = Solución de prueba que no exceda la MDV libre de endotoxina detectable.
Solución B = Solución de prueba adicionada de endotoxina.
Solución C = Control de sensibilidad del lisado.
Solución D = Control negativo de agua para la prueba de endotoxina.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>La prueba se considera válida si:
En las soluciones A y D la reacción es negativa.
El resultado en la solución C confirma la sensibilidad del lisado indicada en el marbete.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Se considera que la muestra no contiene factores de interferencia si el resultado de la media geométrica en la solución B se encuentra entre 0.5 y 2 λ.
En caso contrario repetir la prueba utilizando una dilución mayor sin exceder a la MDV y/o el uso de un lisado con mayor sensibilidad. Para eliminar o disminuir los factores de interferencia en la muestra, se pueden emplear métodos</td><td></td><td></td></tr>
</table>

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
como: dilución, ultrafiltración, ajuste de pH, calentamiento, diálisis, adición de agentes dispersantes o tensoactivos.		
PRUEBAS DE FACTORES DE INTERFERENCIA EN REACTIVOS DEL MÉTODO C. **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: $\Delta URF = URF_{final} - URF_{inicial}$ 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		
La prueba se lleva a cabo a la temperatura de incubación recomendada por el fabricante del reactivo de prueba (normalmente 37 ± 1°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 (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 ± 1°C).		
Pruebas Preparatorias		

CONSULTA

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>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.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>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 más dentro del intervalo indicado por el fabricante para generar la curva estándar. Si el intervalo deseado es mayor que 2 log10, se deben preparar concentraciones adicionales para incluir cada incremento logarítmico de la curva estándar. Ver tabla 316.4.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Tabla 316.4 Preparación de la curva.
<table>
<tr><th>Punto de la Curva</th><th>UE / mL</th><th>Rango</th></tr>
<tr><td></td><td>1.0</td><td></td></tr>
<tr><td></td><td>}</td><td>1 log</td></tr>
<tr><td>1</td><td>0.1</td><td></td></tr>
<tr><td></td><td>}</td><td>1 log</td></tr>
<tr><td>2</td><td>0.01</td><td></td></tr>
<tr><td></td><td>}</td><td>1 log</td></tr>
<tr><td>3</td><td>0.001</td><td></td></tr>
</table></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>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.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>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.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Verificación: Prueba de Factores de Interferencia en reactivos recombinantes.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Como los reactivos recombinantes no son susceptibles de generar falsos positivos por la presencia del factor G, no se</td><td></td><td></td></tr>
</table>

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>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.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Seleccionar una concentración de endotoxina alrededor de la concentración media de la curva estándar. Preparar las soluciones A – D como se muestra en la tabla 316.5. 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.).</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Tabla 316.5. Preparación de soluciones para la prueba de inhibición/realce</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">
<table>
<tr><th>Solución</th><th>Concentración de Endotoxina</th><th>Solución a la que se adiciona endotoxina</th><th>Número de Réplicas</th><th>Propósito</th></tr>
<tr><td>A[a]</td><td>Ninguna</td><td>Solución de muestra</td><td>No menor de 2</td><td>Detectar endotoxina endógena</td></tr>
<tr><td>B[b]</td><td>Concentración media de la curva estándar</td><td>Solución de muestra</td><td>No menor de 2</td><td>Verificar recuperación (control positivo)</td></tr>
<tr><td>C[c]</td><td>Al menos tres concentraciones (la concentración más baja se designa "λ")</td><td>Agua libre de endotoxinas</td><td>Cada una no menor de 2</td><td>Verificar curva estándar (control positivo)</td></tr>
<tr><td>D[d]</td><td>Ninguna</td><td>Agua libre de endotoxinas</td><td>No menor de 2</td><td>Control negativo</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>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</td><td></td><td></td></tr>
</table>

Dice	Debe decir	Justificación*
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 *316.5*), del promedio del control positivo (Solución B, Tabla *316.5*).		
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 % y el 200 % de la concentración conocida de endotoxina adicionada después de restar cualquier endotoxina detectada en la solución sin endotoxina.		
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 o algún otro método para eliminar el factor de interferencia. Existen		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
reactivos que los fabricantes pueden recomendar dependiendo la naturaleza de las muestras, para diluir soluciones coloridas, oleosas, etc.		
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.		
DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS		
MÉTODO A. Método de formación de gel (Prueba límite). Preparar las soluciones A, B, C y D indicadas en la *tabla 0316.6.* Llevar a cabo la prueba de acuerdo al procedimiento descrito en la verificación de la sensibilidad del lisado. La prueba se considera válida si: • Los resultados en la solución D son negativos. • En las soluciones B y C los resultados son positivos.		
La muestra cumple con la prueba, si las réplicas de la solución A dan resultado negativo. La muestra no cumple con la prueba cuando se obtienen resultados positivos para las réplicas de la solución A. Repetir la prueba cuando se obtiene un resultado positivo para una determinación de la solución A y un resultado negativo para la réplica. La muestra en análisis cumple con la prueba, cuando en la repetición se obtienen resultados negativos en ambas determinaciones de la solución A. La muestra no cumple con la prueba si se obtiene un resultado positivo para una o ambas determinaciones repetidas de la solución A. Si la muestra no cumple con la prueba a una dilución menor de la MDV, repetir la prueba empleando una dilución mayor que no excede la MDV. En caso de sospechar la presencia de endotoxina, efectuar		

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>una serie de diluciones con un factor de dilución de dos que no excedan la MDV y proceder de acuerdo al método 2.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Tabla 0316.6 Preparación de soluciones para la prueba límite.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">
<table>
<tr><th></th><th>Solución</th><th>Concentración final de endotoxina</th><th>Réplicas</th></tr>
<tr><td>A</td><td>Solución de prueba</td><td>----</td><td>2</td></tr>
<tr><td>B</td><td>Solución de prueba</td><td>2 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td>C</td><td>Agua libre de endotoxina</td><td>2 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td>D</td><td>Agua libre de endotoxina</td><td>----</td><td>2</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Solución A = Solución de prueba que no exceda la MDV.
Solución B = Control positivo del producto. Solución de prueba conteniendo endotoxina a una concentración final de 2 λ.
Solución C = Control positivo de agua.
Solución D = Control negativo de agua.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>MÉTODO A. Método de formación de gel (Prueba semicuantitativa). Preparar las soluciones A, B, C y D como se muestra en la tabla 0316.7. Realizar la prueba de acuerdo al procedimiento descrito en la verificación de la sensibilidad del lisado.
La prueba se considera válida si:
• Los resultados de la solución D son negativos.
• Los resultados de la solución B son positivos.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>La media geométrica de la concentración del punto final de la solución C, se encuentra en el intervalo de 0.5 a 2 λ.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Cálculos. La concentración de endotoxina en la muestra se determina multiplicando la dilución en el punto final por λ para cada serie de réplicas. Véase la fórmula para el cálculo de la media geométrica en la verificación de la sensibilidad del lisado. Si la muestra se diluyó, calcular la concentración de endotoxina en la solución original, multiplicando el resultado por la dilución.
Si ninguna de las diluciones de la muestra es positiva, en una</td><td></td><td></td></tr>
</table>

CONSULTA

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>prueba válida, informar la concentración de endotoxina como menor al valor de λ (si se analizó una muestra diluida, informar como menor que λ multiplicado por el factor de dilución más bajo de la muestra). Si todas las diluciones son positivas, la concentración de endotoxina se informa como igual o mayor que la mayor dilución multiplicada por λ.
La muestra cumple con los requerimientos de la prueba si la concentración de endotoxina en ambas réplicas es menor a la especificada en la monografía individual.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Tabla 0316.7 Preparación de soluciones para la prueba semicuantitativa.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">
<table>
<tr><th colspan="2">Solución</th><th>Factor de dilución</th><th>Concentración final de endotoxina</th><th>Réplicas</th></tr>
<tr><td rowspan="4">A</td><td>Solución de prueba</td><td>1</td><td>--</td><td>2</td></tr>
<tr><td>Solución de prueba</td><td>2</td><td>--</td><td>2</td></tr>
<tr><td>Solución de prueba</td><td>4</td><td>--</td><td>2</td></tr>
<tr><td>Solución de prueba</td><td>8</td><td>--</td><td>2</td></tr>
<tr><td>B</td><td>Solución de prueba</td><td>1</td><td>2 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td rowspan="4">C</td><td rowspan="4">Agua libre de endotoxina</td><td>1</td><td>2 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td>2</td><td>1 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td>4</td><td>0.5 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td>8</td><td>0.25 λ</td><td>2</td></tr>
<tr><td>D</td><td>Agua libre de endotoxina</td><td>----</td><td>---</td><td>2</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Dispositivos médicos
En el caso de detectarse endotoxina en la prueba límite, calcular la concentración de acuerdo a la siguiente fórmula:

UE/Dispositivo = (λ × V / N)× Factor de dilución

Donde:
N = Número de dispositivos evaluados.
V = Volumen total del líquido de extracción o enjuague.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Los dispositivos que no puedan ser analizados por el método de endotoxina bacteriana por no cumplir con la prueba de</td><td></td><td></td></tr>
</table>

Dice	Debe decir	Justificación*
factores de interferencia deben cumplir con la prueba de pirógenos.		
Solución A. Solución de prueba a una dilución que no exceda la MDV y a la cual cumplió con la prueba de factores de interferencia. Las diluciones subsecuentes de la solución de prueba no deben exceder la MDV. Utilizar agua libre de endotoxina para preparar la serie de diluciones de 4 tubos conteniendo la solución de prueba bajo análisis a las concentraciones de 1, 12, 14, y 18 con respecto a la concentración utilizada en la prueba para factores de interferencia. Si se considera apropiado pueden utilizarse otras diluciones mayores a la MDV. **Solución B.** Control positivo del producto. Solución A conteniendo endotoxina estándar a una concentración final de 2 λ. **Solución C**. Dos réplicas de agua para la prueba de endotoxina conteniendo concentraciones de estándar de endotoxina correspondientes a 2, 1, 0.5 y 0.25 λ. **Solución D.** Control negativo de agua para la prueba de endotoxina.		
MÉTODO B. FOTOMÉTRICOS		
Método turbidimétrico. El método turbidimétrico de punto final se basa en la relación cuantitativa que existe entre la concentración de endotoxina y la turbiedad (absorbancia o transmitancia) de la mezcla de reacción al final de un periodo de incubación. El método cinético mide, el tiempo necesario para que la mezcla de reacción alcance una absorbancia predeterminada o el grado de turbiedad desarrollada. La prueba se lleva a cabo a la temperatura y tiempo de incubación recomendada por el fabricante del lisado (normalmente 37 ± 1 ºC).		
Método cromogénico. En este método se mide el cromóforo liberado de un péptido cromogénico, al reaccionar el lisado con la endotoxina. El método de punto final, se basa en la relación cuantitativa entre la concentración de endotoxina y la cantidad de		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
cromóforo liberado al final del periodo de incubación. El método cinético mide el tiempo que tarda la reacción en alcanzar una absorbancia predeterminada o el grado de color desarrollado. La prueba se lleva a cabo en las condiciones recomendadas por el fabricante del lisado (normalmente 37 ± 1 °C).		
PRUEBAS PRELIMINARES Antes de llevar a cabo los métodos fotométricos es necesario: • Asegurar los criterios para la curva estándar. • Que la solución de prueba no interfiera con el método.		
Criterios para la curva estándar. La prueba debe realizarse a cada lote de reactivo de LAL. A partir de la solución control estándar de endotoxina (CEE), preparar una curva estándar utilizando al menos tres diluciones por triplicado. Efectuar la prueba de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del lisado (relación de volumen, tiempo, temperatura de incubación, pH, etc.). Si el intervalo deseado es mayor de 2 log en los métodos cinéticos, se deben incluir estándares adicionales para que cada aumento logarítmico esté comprendido en el intervalo de la curva estándar. El valor absoluto del coeficiente de correlación, r, debe ser mayor o igual a 0.980 para el intervalo de concentraciones de endotoxina utilizadas.		
Determinación de factores de interferencia. Seleccionar una concentración de endotoxina igual o cercana a la mitad de la curva estándar. Preparar las soluciones A, B, C y D como se muestra en la *tabla 0316.8*. Realizar la prueba en las condiciones recomendadas por el fabricante del lisado (volumen del lisado y de la solución de prueba, tiempo, de incubación, etc.). La prueba es válida si ~~se cumplen las siguientes condiciones~~: 1. El valor absoluto del coeficiente de variación de la curva estándar generada utilizando la solución C es mayor o igual a		

CONSULTA

Dice	Debe decir	Justificación*
0.980. 2. El resultado de la solución D no excede el límite del valor del blanco requerido en la descripción del lisado empleado como reactivo o es menor que el límite de detección de endotoxina del lisado empleado como reactivo. Calcular la recuperación media de la endotoxina agregada restando la concentración media de endotoxina en la solución, si la hubiera (solución A, *tabla 0316.8.*), de la que contiene la endotoxina agregada (solución B, véase *tabla 0316.8*). Si la solución de prueba está libre de factores de interferencia, la concentración de la endotoxina adicionada a la solución de prueba está entre 50 y 200 % de la concentración de endotoxina adicionada, después de restar cualquier cantidad de endotoxina detectada en la solución a la cual no se adicionó endotoxina. Cuando el recobro de endotoxina está fuera del intervalo especificado, se considera que la solución de prueba contiene factores de interferencia. En este caso se debe repetir la prueba utilizando una dilución mayor que no exceda la MDV. El factor de interferencia de la solución de prueba también podría eliminarse con un tratamiento validado como por ejemplo, filtración, neutralización, diálisis o calentamiento. Para establecer que el tratamiento elegido elimina la interferencia sin pérdida de endotoxina, realizar la valoración descrita anteriormente usando la preparación a examinar a la que se ha agregado endotoxina estándar y se ha sometido posteriormente al tratamiento seleccionado.		
DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS POR LOS MÉTODOS FOTOMÉTRICOS Preparar las soluciones como se indica en la *tabla 0316.8.*		
Cálculos. Calcular la concentración de endotoxina de cada réplica de la solución A utilizando la curva estándar (solución C).		
La prueba se considera válida si:		

CONSULTA

CONSULTA

<table>
<tr><th>Dice</th><th>Debe decir</th><th>Justificación*</th></tr>
<tr><td>

- El resultado obtenido en la solución D no excede el límite del valor especificado por el fabricante del lisado o es menor que el límite de detección del lisado empleado.
- Los resultados obtenidos en la curva estándar (solución C) cumplen con los requerimientos definidos en la validación.
- La concentración de endotoxina determinada en la solución B, después de restar la cuantificada en la solución A, debe estar en el intervalo entre 50 y 200 %.

</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>La muestra cumple con la prueba si la concentración media de endotoxina de las réplicas de la solución A, después de tomar en cuenta la corrección por dilución y concentración, es menor del límite de endotoxina especificado en la monografía del producto.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Tabla 0316.8. Preparación de soluciones para la prueba de interferencia en los métodos fotométricos.</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">
<table>
<tr><th colspan="2">Solución</th><th>Concentración de endotoxina</th><th>Réplicas</th></tr>
<tr><td>A</td><td>Solución de prueba</td><td>-----</td><td>Al menos 2</td></tr>
<tr><td>B</td><td>Solución de prueba</td><td>Concentración media de la curva estándar</td><td>Al menos 2</td></tr>
<tr><td>C</td><td>Agua libre de endotoxinas</td><td>Al menos tres concentraciones la más baja es λ</td><td>Al menos 2
para cada concentración</td></tr>
<tr><td>D</td><td>Agua libre de endotoxinas</td><td>------</td><td>Al menos 2</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>Solución A = Solución de prueba, sin exceder la MDV.
Solución B = Solución de prueba, adicionada de endotoxina en una concentración igual o cercana a la concentración media de la curva estándar.
Solución C = Curva estándar (controles positivos) a las concentraciones utilizadas en la validación del método descrito.
Solución D = Control negativo de agua para la prueba de endotoxina.</td><td></td><td></td></tr>
</table>

Dice	Debe decir	Justificación*
DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS EN MUESTRAS DE PRUEBA POR MÉTODO C Seguir el procedimiento descrito para la Verificación: Prueba de Factores de Interferencia en reactivos recombinantes.		
Cálculo		
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.		
La prueba es válida si: 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.

Formato **EP-PO-214/05-2**

CONSULTA