

ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

VALIDATION OF THE ANALYTICAL TECHNIQUE FOR THE TEST OF BACTERIAL ENDOTOXINS (GEL-CLOT) IN CENTRAL VENOUS CATHETER OF 30 CM

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA PARA LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS (GEL-CLOT) EN CATETER VENOSO CENTRAL DE 30 CM

Jorge Luis Ullilen¹ & José Iannacone²

1 Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú

2 Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú

Author for correspondence: E-mail: jose.iannacone@urp.edu.pe

ABSTRACT

Within the quality control of pharmaceutical products, the quantification of bacterial endotoxins is established by the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) method by means of a coagulation reaction and gel formation (gel-clot). The test was validated in the central venous catheter product of 30 cm, with which we worked with qualified equipment, validated depyrogenation process, current reagents and apyrogen material. The sensitivity of the LAL reagent (0.03 EU · mL⁻¹) was checked and the maximum valid dilution (MVD) of 1/8 was calculated. The tests showed that the product does not inhibit or potentiate the reaction of the reagent. The conditions for the validation of LAL by the gel-clot method in this product were standardized. The method is extended for the determination of bacterial endotoxins in other medical devices by intravenous route and to demonstrate that its use is valid for compliance with the regulations.

Keywords: Central venous catheter – quality control – bacterial endotoxins – maximum valid dilution

RESUMEN

Dentro del control de calidad de los productos farmacéuticos, se establece la cuantificación de endotoxinas bacterianas por el método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), mediante una reacción de coagulación y formación de un gel (gel-clot). Se validó la prueba en el producto catéter venoso central de 30 cm, para lo cual se trabajó con equipos calificados, proceso de despirogenización validado, reactivos vigentes y material apirógeno. Se comprobó la sensibilidad del reactivo de LAL ($0,03 \text{ UE} \cdot \text{mL}^{-1}$) y se calculó la máxima dilución válida (MVD) de 1/8. Las pruebas demostraron que el producto no inhibe ni potencia la reacción del reactivo. Se estandarizaron las condiciones para la validación de LAL por el método gel-clot en este producto. El método se hace extensivo para la determinación de endotoxinas bacterianas en otros dispositivos médicos por vía endovenosa y demostrar que es válido su uso para el cumplimiento de la normativa.

Palabras clave: catéter venoso central – control de calidad – endotoxinas bacterianas – máxima dilución válida

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la calidad, inocuidad y seguridad de los productos farmacéuticos son de importancia, debido a su amplio uso en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades. Para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), las Buenas Prácticas de Manufactura en el control de calidad, una de las exigencias es la validación de las técnicas analíticas, para lo cual se requiere de la calificación de los equipos que intervienen en la prueba, la validación del desempeño de los equipos y la validación de la prueba propiamente dicha, con el fin de garantizar la confiabilidad de los resultados. La calificación de los equipos se divide normalmente en tres segmentos: calificación de instalación, calificación operativa y calificación de desempeño (OMS, 1998). La calificación de los equipos tiene como objetivo

asegurar que el equipo sea el adecuado para la labor que realiza, que su instalación y su operación se encuentren de acuerdo a los requisitos entregados por el fabricante y por último, que el desempeño del equipo sea óptimo, es decir, los parámetros de funcionamiento permanezcan estables y con las mismas características durante el proceso (Novitsky, 1991, 1994; Fariña, 2006; Cervantes *et al.*, 2009).

En relación con cada prueba de operación y desempeño, la prueba se efectúa tres veces consecutivas a efecto de demostrar que los equipos cumplan uniformemente los criterios de aceptación (Groven, 1990; IAEA, 1992; OMS, 1998; García, 2009; IHC, 2010).

Para asegurar que los materiales que se utilizan en el proceso no interfieran en los resultados, se realiza la validación del proceso de despirogenización, el cual se define como la elimi-

nación de todas las sustancias pirogénicas, incluyendo las endotoxinas bacterianas. El método más común para eliminar pirógenos es el mecanismo de despirogenización por calor seco (Pérez, 1996; WHO, 2011; EP, 2012; EI, 2016). El método clásico y más efectivo para la despirogenización de materiales termorresistentes es mediante la aplicación de calor seco en hornos. En la validación, se determina con bioindicadores de endotoxinas y se cuantifica con el empleo del ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) por el método gel-clot (Joiner *et al.*, 2002; Perdomo & Montero, 2003; Osorio *et al.*, 2007; Akbar *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2014).

En la industria farmacéutica, los ambientes de los laboratorios, el personal, los implementos y equipos de trabajo, así como el agua y materias primas, albergan microorganismos que se desarrollan y afectan la calidad de los productos (Zimmer & Spies, 1979). Un contaminante propio de origen bacteriano son las denominadas endotoxinas provenientes de las bacterias gram-negativas (Joiner *et al.*, 2002; Carrillo *et al.*, 2006; FA, 2012). La manufactura de dispositivos médicos involucra una serie de operaciones y controles orientados a obtener productos que cumplan las especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, dando énfasis en asegurar su esterilidad y evitar la presencia de agentes contaminantes (microorganismos, partículas y pirógenos). Las pruebas microbiológicas que se realizan para los dispositivos médicos estériles como

productos finales, son dos: la esterilidad que garantiza la ausencia de microorganismos, y las endotoxinas bacterianas que cumplen con el límite de endotoxinas (Joiner *et al.*, 2002; USP, 2012abc; Dobrovolskaia *et al.*, 2014; Wheeler, 2017).

El uso de dispositivos médicos estériles contaminados con endotoxinas, pueden inducir muchas respuestas biológicas, así la reacción pirógena puede manifestarse en liberación de histamina y alteración de la permeabilidad vascular. Estas respuestas pueden poner o no en peligro la vida del individuo, dependiendo del estado del paciente y de la cantidad de endotoxina inyectada. Las endotoxinas son muy potentes, una dosis de solamente 1 a 10 ng·Kg⁻¹ de endotoxina purificada es capaz de provocar en el hombre una respuesta febril (Pérez, 1996; Joiner *et al.*, 2002).

Es por ello que la industria farmacéutica requiere estandarizar técnicas rápidas y confiables, que permitan detectar la presencia de endotoxinas bacterianas, como lo es la prueba de LAL. Esta prueba se basa en la aglutinación de extractos de amebocitos de sangre de *Limulus* (O.F. Müller, 1785) producido por cantidades del orden de pg de lipopolisacáridos y puede detectar 300 células de *Escherichia coli* (Migula 1895) (Aldaña, 1997; Caro & Cruz, 2006; Burguet & Brito, 2012; Mitra *et al.*, 2014). El método detecta células viables y no viables (Carrillo *et al.*, 2006). En tanto una alternativa para detectar pirógenos, es el ensayo de pirógenos en conejos, capaz de de-

tectar cualquier sustancia pirogénica, el ensayo de LAL solo detecta endotoxinas (Joiner *et al.*, 2002; Solís, 2004; Wheeler, 2017).

Se ha comprobado la equivalencia entre el ensayo LAL y la prueba de pirógenos (Sandle, 2012). El ensayo LAL resultó ser al menos 10 veces más sensible y es considerado un método de cuantificación. Es la prueba más sensible existente para detectar endotoxinas producidas por bacterias Gram-negativas y el procedimiento es simple, específico, rápido, sensible y económico, comparándolo con la prueba de pirógenos en conejos de la USP (Pérez, 1996; Burguet *et al.*, 2012; Dobrovolskaia *et al.*, 2014; Wheeler, 2017).

Si bien las endotoxinas no son los únicos agentes pirógenos, las endotoxinas son los pirógenos que preocupan a la industria farmacéutica debido a que se han encontrado entre los lotes contaminados y debido a su alta resistencia a la destrucción térmica y química, sobreviven a los métodos ordinarios de esterilización (Carrillo *et al.*, 2006; Wheeler, 2017). Las otras fuentes de pirogenicidad (contaminación química o por partículas) pueden ser controladas siguiendo métodos de fabricación cuidadosos, pero las endotoxinas son difíciles de eliminar porque resisten la degradación por esterilización con vapor y no se eliminan tampoco por los medios normales de filtración. Las endotoxinas son compuestos químicos complejos que se encuentran exclusivamente en la membrana externa de la pared celular de las bacterias Gram-

negativas (Pérez, 1996), las cuales crecen en las soluciones con un mínimo de nutrientes, tales como el agua almacenada después de la destilación o desionización (Ouédraogo *et al.*, 2009). Generalmente es antieconómico y en ocasiones prácticamente imposible, eliminar la contaminación pirógena una vez que está presente (Carrillo *et al.*, 2006).

La endotoxina es el lipopolisacárido (LPS) de alto peso molecular componente de la pared celular externa de las bacterias gram-negativas que causa fiebre, meningitis, y una caída rápida de la presión sanguínea, si se introducen en la sangre o en los tejidos del cuerpo. Los componentes de la célula de pared exterior, se componen principalmente de proteínas, fosfolípidos, y LPS, que constantemente liberan en el entorno cuando las bacterias Gram-negativas se dividen o lisan (Neugodova *et al.*, 2003; Wheeler, 2017).

El objetivo del presente trabajo fue realizar la validación de la técnica analítica para la prueba de endotoxinas bacterianas-método gel-clot en un catéter venoso central de 30 cm.

MATERIALES Y MÉTODOS

AMBITO DE ESTUDIO

El desarrollo de la validación de la técnica analítica para la prueba de endotoxinas bacterianas-método gel-clot en el catéter venoso central de 30 cm, se realizó en las instalaciones de la empresa Dentilab del Perú, en la sección de microbiología, en el área de recuento microbiano.

EQUIPOS E INSTRUMENTOS PARA LA CALIFICACIÓN DE EQUIPOS

La Tabla 1 indica los equipos e instrumentos empleados para la calificación de equipos.

Tabla 1. Equipos e instrumentos que intervienen en la calificación de equipos para la prueba de endotoxinas bacterianas.

DESCRIPCIÓN	MARCA	MODELO	SERIE
BAÑO DE AGUA	MEMMERT	WNE 14	L407.0499
HORNO ESTERILIZADOR	MEMMERT	UNE500	C506.0691
SENSOR DE TEMPERATURA PT 1000	-----	-----	-----
TERMOMETRO DIGITAL	FLUKE 52 II	LM200	11050136
CAJA DE CONMUTACION	COLE PARMER	-----	254863

EQUIPOS, INSTRUMENTOS, MATERIALES Y REACTIVOS QUE INTERVIENEN EN LA VALIDACIÓN DEL PROCESO DE DESPIROGENIZACION.

La Tabla 2 indica los equipos e instrumentos empleados para la validación del proceso de despirogenización.

Tabla 2. Equipos e instrumentos que intervienen en la validación del proceso de despirogenización para la prueba de endotoxinas bacterianas. *Calibrado por Unimetro.

DESCRIPCIÓN	MARCA	MODELO	SERIE	CALIBRACIÓN
BAÑO DE AGUA	MEMMERT	WNE 14	L407.0499	Fecha de Calibración:* Marzo 2012 Próxima Calibración: Marzo 2013
HORNO ESTERILIZADOR	MEMMERT	UNE500	C506.0691	Fecha de Calibración:* Marzo 2012 Próxima Calibración: Marzo 2013
MICROPIPETA 20 - 200 uL.	HTL LABMATE	LM200	846051086	Fecha de Calibración:* Abril 2012 Próxima Calibración: Abril 2013

Continúa Tabla 2

Continúa Tabla 2

MICROPIPETA 20 - 200 uL.	HTL LABMATE	LM200	846051073	Fecha de Calibración:* Abril 2012 Próxima Calibración: Abril 2013
VORTEX	BSM	-----	254863	No aplica

La Tabla 3 indica los equipos calificados empleados para la validación del proceso de despirogenización.

Tabla 3. Equipos calificados que intervienen en la validación del proceso de despirogenización para la prueba de endotoxinas bacterianas. **Calificado por Kossodo.

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN	EMPRESA	CALIFICACIÓN
BAÑO DE AGUA	37 °C	Kossodo SAC	Fecha de Calificación: ** Abril 2012 Próxima Calificación: Abril 2013
HORNO ESTERILIZADOR	250 °C	Kossodo SAC	Fecha de Calificación: ** Abril 2012 Próxima Calificación: Abril 2013

La Tabla 4 indica los materiales y reactivos empleados para la validación del proceso de despirogenización.

Tabla 4. Materiales y reactivos que intervienen en la validación del proceso de despirogenización para la prueba de endotoxinas bacterianas. *Proveedor Gen Lab del Perú.

PRODUCTO	LOTE	FECHA DE EXPIRA	CARACTERÍSTICAS	PROVEEDOR
AGUA REACTIVO LAL	99732101	Oct. 2013	Contiene: < 0.005 EU/mL	Gen Lab*
INDICADOR DE ENDOTOXINAS DE 10,000 EU	XXX	XX	XX	Gen Lab*
REACTIVO LAL	B4711L	Oct. 2014	Sensibilidad: 0.03 EU	Gen Lab*
TUBOS DE GRADO LAL	63451D	Oct. 2014	Tubos de 10x75 mm. despirogenizados envueltos en papel aluminio sin tapas	Gen Lab*
TIPS GRADO LAL	110921-201	Oct. 2013	Tips de 100u L.	Gen Lab*

La Tabla 5 indica los materiales del proceso de despirogenización. auxiliares empleados para la validación

Tabla 5. Materiales auxiliares que intervienen en la validación del proceso de despirogenización para la prueba de endotoxinas bacterianas.

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN	PROCESO
TIJERAS	Apirógeno	Despirogenización
PINZAS	Apirógeno	Despirogenización
TUBOS 3x100	Apirógeno	Despirogenización
PAPEL ALUMINIO	Apirógeno	Despirogenización
PIPETAS GRADUADAS 10 mL 5 mL, 2 mL. 1 mL.	Apirógeno	Despirogenización
MANDIL	Estéril	Calor húmedo

EQUIPOS, INSTRUMENTOS, MATERIALES Y REACTIVOS QUE INTERVIENEN EN LA VALIDACION DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS.

La Tabla 6 indica los equipos e instrumentos empleados para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 6. Equipos e instrumentos que intervienen en la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas. *Calibrado por Unimetro.

DESCRIPCIÓN	MARCA	MODELO	SERIE	CALIBRACIÓN
BAÑO DE AGUA	MEMMERT	WNE 14	L407.0499	Fecha de Calibración:* Marzo 2012 Próxima Calibración: Marzo 2013
HORNO ESTERILIZADOR	MEMMERT	UNE500	C506.0691	Fecha de Calibración: * Marzo 2012 Próxima Calibración: Marzo 2013
MICROPIPETA 20 – 200 uL	HTL LABMATE	LM200	846051086	Fecha de Calibración: * Abril 2012 Próxima Calibración: Abril 2013
MICROPIPETA 20 – 200 uL	HTL LABMATE	LM200	846051073	Fecha de Calibración: * Abril 2012 Próxima Calibración: Abril 2013
VORTEX	BSM	-----	254863	No aplica

La Tabla 7 indica los equipos calificados empleados para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 7. Equipos calificados que intervienen en la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas. **Calificado por Kossodo.

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN	EMPRESA	CALIFICACIÓN
BAÑO DE AGUA	37 °C	Kossodo SAC	Fecha de calificación: ** Abril 2012 Próxima calificación: Abril 2013 Fecha de calificación: **
HORNO ESTERILIZADOR	250 °C	Kossodo SAC	Abril 2012 Próxima calificación: Abril 2013

La Tabla 8 indica los materiales y reactivos empleados para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 8. Materiales y reactivos que intervienen en la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas. *Proveedor Gen Lab del Perú.

PRODUCTO	LOTE	FECHA DE EXPIRA	CARACTERÍSTICAS	PROVEEDOR
AGUA REACTIVO LAL	99732101	Oct. 2013	Contiene: < 0.005 EU/ ML.	Gen Lab*
CONCENTRACIÓN ESTANDAR DE ENDOTOXINAS	EM83092	Oct. 2013	Concentración: 10 000 UE/vial	Gen Lab*
REACTIVO LAL	B4711L	Oct. 2014	Sensibilidad: 0.03 EU	Gen Lab*
TUBOS DE GRADO LAL	63451D	Oct. 2014	Tubos de 10x75 mm despirogenizados envueltos en papel aluminio sin tapas	Gen Lab*
TIPS GRADO LAL	110921-201	Oct. 2013	Tips de 100u L.	Gen Lab*

La Tabla 9 indica los materiales auxiliares empleados para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 9. Materiales auxiliares que intervienen en la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

DESCRIPCIÓN	ESPECIFICACIÓN	PROCESO
TIJERAS	Apirógeno	Despirogenización
PINZAS	Apirógeno	Despirogenización
TUBOS 3x100	Apirógeno	Despirogenización
PAPEL ALUMINIO	Apirógeno	Despirogenización
PIPETAS GRADUADAS 10 mL 5 mL, 2 mL. 1 mL.	Apirógeno	Despirogenización
MANDIL	Estéril	Calor Húmedo

MUESTRA Y PERSONAL QUE INTERVIENEN EN LA VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS.

La Tabla 10 indica la muestra empleada para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 10. Muestra que interviene en la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

PRODUCTO	LOTE	Cantidad	FECHA DE EXPIRA	NÚMERO DE DISPOSITIVOS PARA LOS ENSAYOS
El Catéter Venoso Central de 30 cm.	10208042	77 000 unidades	Enero - 2017	09 UNIDADES

La Tabla 11 indica el personal que intervino en la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 11. Personal que intervino en la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

MATERIALES DESPIROGENIZADOS	EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA	PRUEBA DE SENSIBILIDAD	PRUEBA DE INHIBICION O POTENCIACION
Responsables: Analista 1	Responsables: Analista 1	Responsables: Analista 1	Responsables: Analista 1
PRUEBA DE LÍMITE DE COAGULACIÓN	PRUEBA DE GEL-CLOT	ROBUSTEZ	PRECISION
Responsables: Analista 1	Responsables: Analista 1	Responsables: Analista 1	Responsables: Analista 1

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

METODOLOGÍA DE LA CALIFICACION DE EQUIPOS.

CALIFICACION DEL HORNO ESTERILIZADOR.

CALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN DEL HORNO ESTERILIZADOR.

En la calificación de instalación se demostró que el Horno Esterilizador HE-004 cumple con las especificaciones de diseño y ha sido instalada adecuadamente de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La calificación de instalación trató los siguientes puntos:

- Conexiones útiles.
- Instalación del equipo.

- Suministro de Energía eléctrica.
- Características del Horno Esterilizador.
- Estructura y función del equipo.
- Dispositivos de seguridad.
- Limpieza del equipo.
- Mantenimiento preventivo.

CALIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL HORNO ESTERILIZADOR.

La calificación de operación sirve para demostrar que todos los componentes y subsistemas que conforman el Horno Esterilizador HE-004, operan de manera correcta. Para llevar a cabo la calificación de operación se hará empleo del instructivo I-MIC.07. Uso del Horno Esterilizador HE-004 y del Manual del Equipo. La empresa Kossodo realizó

el servicio de calificación haciendo empleo de un termómetro patrón digital de código IT-18 de marca FLUKE 52 II de serie: 11050136, con 0,1 °C de resolución con 10 sensores tipo “K” de códigos K3-1 al K3-10 que trabaja conjuntamente con una caja de conmutación tipo T de código IT-03/K de marca: Cole Parmer, procedencia USA. Los sensores fueron distribuidos de manera uniforme dentro del cuerpo del Horno Esterilizador HE-004, siendo colocados cinco por cada nivel de trabajo. La calificación evaluó el parámetro de Temperatura, siendo la especificación establecida por el usuario de: 250°C ± 5°C. La calificación de operación se realizó por 3 ensayos sin carga. La calificación de operación trató los siguientes puntos:

Procedimiento Operativo estándar.

Variables a verificar del proceso.

Descripción del Manejo y Uso.

Variables claves del proceso de la incubadora.

Equipos necesarios para realizar las pruebas.

Comprobación de los Controles.

Proceso de operación.

Distribución de calor sin carga

Primer Proceso de Operación sin carga.

Segundo Proceso de Operación sin carga.

Tercer Proceso de Operación sin carga.

CALIFICACIÓN DE DESEMPEÑO DEL HORNO ESTERILIZADOR.

La calificación de desempeño demostró que el Horno Esterilizador

HE-004 cumple uniformemente a través del tiempo con las especificaciones establecidas por el usuario, tanto en condiciones normales como en las peores condiciones posibles. Para la calificación de desempeño se empleó instructivo I-MIC.07 Uso del Horno Esterilizador HE-004 y del Manual del Equipo. La empresa Kossodo realizó el servicio de calificación haciendo empleo de un termómetro patrón digital de código IT-18 de marca FLUKE 52 II de serie: 11050136, con 0,1 °C de resolución con 10 sensores tipo “K” de códigos K3-1 al K3-10 que trabaja conjuntamente con una caja de conmutación tipo T de código IT-03/K de marca: Cole Parmer®, procedencia USA. Los sensores fueron distribuidos de manera uniforme dentro del cuerpo del Horno Esterilizador HE-004, siendo colocados cinco por cada nivel de trabajo. La calificación de desempeño evalúa el parámetro de Temperatura, siendo la especificación establecida por el usuario de: 250°C ± 5°C. La calificación de desempeño se realizó por 3 ensayos con carga al 100%. La calificación de desempeño trató los siguientes puntos:

Variables claves del proceso de incubación.

Proceso de operación.

Distribución de calor con carga 250°C ± 5°C.

Primer Proceso de Operación con carga.

Segundo Proceso de Operación con carga.

Tercer Proceso de Operación con carga.

Concluido los ensayos de calificación, los datos fueron analizados estadísticamente, hallándose lo siguiente: T° Promedio A (°C): Temperatura promedio en un instante de tiempo dado. T° Promedio B (°C): Temperatura promedio de un sensor durante todo el ensayo. T° Mínima B (°C): Temperatura mínima de un sensor durante todo el ensayo. T° Máxima B (°C): Temperatura máxima de un sensor durante todo el ensayo.

Criterio de Aceptación: La prueba se considera correcta si durante los ensayos la temperatura permanece dentro de las especificaciones establecidas por el usuario, caso contrario se procede a repetir el ensayo.

CALIFICACION DEL BAÑO DE AGUA.

CALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN DEL BAÑO DE AGUA.

En la calificación de instalación se demostró que el Baño de Agua BM-005 cumple con las especificaciones de diseño y ha sido instalada adecuadamente de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La calificación de instalación trató los siguientes puntos:

- Conexiones útiles.
- Instalación del equipo.
- Suministro de Energía eléctrica.
- Características del Baño de Agua.
- Estructura y función del equipo.
- Dispositivos de seguridad.
- Limpieza del equipo.
- Mantenimiento preventivo.

CALIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL BAÑO DE AGUA.

La calificación de operación sirve para demostrar que todos los componentes y subsistemas que conforman el Baño de Agua BM-005, operan de manera correcta. Para llevar a cabo la calificación de operación se empleó el instructivo I-MIC.09 Manejo del Baño de Agua BM-005 y del Manual del Equipo. La empresa Kossodo realizó el servicio de calificación haciendo empleo de un termómetro patrón digital de código IT-18 de marca FLUKE 52 II de serie: 11050136, con 0,1 °C de resolución con 10 sensores tipo "K" de códigos K3-1 al K3-10 que trabaja conjuntamente con una caja de conmutación tipo T de código IT-03/K de marca: Cole Parmer®, procedencia USA. Los sensores fueron distribuidos de manera uniforme dentro del cuerpo del Baño de Agua BM-005, siendo colocados cinco por cada nivel de trabajo. La calificación de desempeño evaluó el parámetro de Temperatura, siendo la especificación establecida por el usuario de: 37°C ± 1°C. La calificación de operación se realizó por 3 ensayos sin carga. La calificación de operación trató los siguientes puntos:

- Procedimiento Operativo estándar.
- Variables a verificar del proceso.
- Descripción del Manejo y Uso.
- Variables claves del proceso de la incubadora.
- Equipos necesarios para realizar las pruebas.
- Comprobación de los Controles.
- Proceso de operación.
- Distribución de calor sin carga

Primer Proceso de Operación sin carga.

Segundo Proceso de Operación sin carga.

Tercer Proceso de Operación sin carga.

CALIFICACIÓN DE DESEMPEÑO DEL BAÑO DE AGUA.

La calificación de desempeño demostró que el Baño de Agua BM-005 cumple uniformemente a través del tiempo con las especificaciones establecidas por el usuario, tanto en condiciones normales como en las peores condiciones posibles. Para la calificación de desempeño se empleó instructivo I-MIC.09 del Baño de Agua BM-005 y Manual del Equipo. La empresa Kossodo realizó el servicio de calificación haciendo empleo de un termómetro patrón digital de código IT-18 de marca FLUKE 52 II de serie: 11050136, con 0,1 °C de resolución con 10 sensores tipo “K” de códigos K3-1 al K3-10 que trabaja conjuntamente con una caja de conmutación tipo T de código IT-03/K de marca: Cole Parmer®, procedencia USA. Los sensores fueron distribuidos de manera uniforme dentro del cuerpo del Baño de Agua BM-005, siendo colocados cinco por cada nivel de trabajo. La calificación de desempeño evaluó el parámetro de Temperatura, siendo la especificación establecida por el usuario de: 37°C ± 1°C. La calificación de desempeño se realizó por 3 ensayos con carga al 100%. La calificación de desempeño trató los siguientes puntos:

Variables claves del proceso de incubación.

Proceso de operación.

Distribución de calor con carga

Primer Proceso de Operación con carga

Segundo Proceso de Operación con carga

Tercer Proceso de Operación con carga

Concluido los ensayos de calificación, los datos fueron analizados estadísticamente, hallándose lo siguiente: T° Promedio A (°C): Temperatura promedio en un instante de tiempo dado. T° Promedio B (°C): Temperatura promedio de un sensor durante todo el ensayo. T° Mínima B (°C): Temperatura mínima de un sensor durante todo el ensayo. T° Máxima B (°C): Temperatura máxima de un sensor durante todo el ensayo.

Criterio de Aceptación: La prueba se considera correcta si durante los ensayos la temperatura permanece dentro de las especificaciones establecidas por el usuario y caso contrario se procede a repetir el ensayo.

VALIDACIÓN DEL CICLO DE DESPIROGENIZACIÓN POR CALOR SECO CON EL EMPLEO DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS-TÉCNICA GEL-CLOT

Aplica a los materiales que intervienen en el ciclo de despirogenización en el horno esterilizador de código interno HE-004, ubicado en el área de equipos de Microbiología, para verificar el cum-

plimiento de las especificaciones.

INDICADOR DE ENDOTOXINA UTILIZADO PARA LA VALIDACION DEL PROCESO DE DESPIROGENIZACION.

Cada vial contiene aproximadamente 10,000 EU (Endotoxin units) de lipopolisacáridos de *E. coli* 055:B5, como certifica Charles River Endosafe luego de haber contrastado con estándares de referencia. El vial de indicador, está hecho con Type I Flint glass, parece vacío, porque la endotoxina liofilizada no ha sido mezclada con estabilizadores ni otras sustancias de soporte o llenado. Se recomienda almacenar los viales de 2 a 25 °C con su tapa intacta. Los indicadores de endotoxina son solo para uso *in vitro* y no debe ser usado en humanos ni animales.

PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN DEL PROCESO DE DESPIROGENIZACION.

Exposición de viales: Para la validación del proceso de despirogenización de hornos, se ubicó los indicadores de endotoxinas en los puntos más fríos hallados en la calificación del horno esterilizador. Inmediatamente antes de la exposición, se removió la tapa del vial y se reemplazó con papel aluminio apirógeno. Posteriormente se expusieron los viales al proceso de despirogenización.

Preparación para el análisis: Después que los indicadores de endoto-

xinas han sido expuestos; los viales expuestos y los viales sin exposición (controles positivos) se acondicionaron para su análisis. Los indicadores fueron ensayados mediante el método gel-clot. Se rehidrató cada vial (vial expuesto y no expuesto) con 1 mL de agua reactivo LAL y se vortexeó por 2 min inicialmente y luego por 1 min cada 10 min por media h. El análisis se realizó lo más pronto posible para una mejor recuperación de la endotoxina.

Procedimiento del ensayo por el método gel-clot: Se verificó la cantidad de endotoxina en los viales no expuestos (controles positivos). Se realizó las diluciones del indicador de endotoxina expuesto y no expuesto, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10,000. El número de diluciones estuvo en función a la sensibilidad del lisado a utilizar. Se realizó la Técnica de LAL en los viales procesados y no procesados. Se halló el logaritmo de la cantidad de endotoxina del vial procesado y no procesado. Se restó el logaritmo de endotoxina del vial procesado del logaritmo de endotoxinas del vial no procesado. En caso de que el resultado del vial procesado y sus diluciones sean negativos, se consideró, el logaritmo de la sensibilidad del lisado como la cantidad a sustraer de la cantidad inicial.

Criterio de aceptación: La prueba se consideró correcta si el proceso de despirogenización cuando el ciclo de despirogenización re-

duce por lo menos 1000 UE = (3-log).

VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS-MÉTODO GEL-CLOT

La prueba LAL por el método de gel-clot, es el método más sencillo, más rápido y más adecuado cuyos resultados son fáciles de leer, ya que sólo hay positivos o negativos. El objetivo de éste trabajo fue determinar su aplicación al dispositivo médico en el Catéter Venoso Central de 30 cm, para ello se siguió los siguientes pasos: Preparación de la solución madre del estándar de endotoxina y las soluciones estándar. Preparación de Reactivo LAL. Prueba de confirmación de Sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo LAL. Determinación de la Máxima Dilución Válida. Prueba de Factores de interferencia para el método gel-clot. Pruebas de inhibición y de Potenciación. Prueba de limite de coagulación. Método gel-clot.

PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS-MÉTODO GEL-CLOT

Preparación de la solución madre del estándar de endotoxina y las soluciones estándar: El reactivo estándar de endotoxina tiene una potencia de 10 000 unidades de endotoxinas (UE) por vial. Se reconstituyó todo el contenido del vial con 5 mL de agua LAL, se mezcló intermitentemente durante 30 min con un mezclador (vortex) y se usó del vial para obtener las diluciones en concentraciones adecuadas. El tiempo de al-

macenamiento de esta solución madre no debe exceder los 14 días a temperatura controlada entre 2° - 8°C para ser utilizada en preparación de diluciones posteriores. Antes de usar, se agitó el vial por 3 min. Cuando se prepararon las diluciones se agitó por no menos de 30 seg antes de la siguiente preparación.

Preparación de Reactivo LAL: Se reconstituyó el contenido del vial con 5.2 mL de agua LAL, y se dejó en reposo (no se agitó).

Prueba de confirmación de Sensibilidad declarada en la etiqueta el Reactivo LAL: Consistió en verificar si el reactivo LAL tiene la sensibilidad declarada comparándolo con la concentración estándar de endotoxinas. Se define como sensibilidad, a la capacidad del reactivo para reaccionar con una concentración de endotoxinas mínima suficiente para dar un resultado positivo. Se expresó con el símbolo λ (Lambda).

Preparación de la solución de stock de endotoxinas: Se preparó una serie de diluciones de la dilución madre del estándar de endotoxinas en agua LAL para obtener concentraciones de: 2λ , λ , $0,5\lambda$, $0,25\lambda$ (tabla 12) en donde la sensibilidad declarada del reactivo es $\lambda=0,03$ UE·mL⁻¹.

Tabla 12. Diluciones para la prueba de sensibilidad declarada del reactivo LAL de la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Dilución	-----	1	2	3	4	5	6	7	8
ERE (0,03)	Vial	300µL A	100µL B	100µL C	100µL B	100µL C	100µL D	100µL E	100µL F
Agua LAL	5 mL	700µL	900µL	900µL	900µL	900µL	900µL	900µL	900µL
Concentracion (EU/mL)		600	60	6	0,6	(2λ)	(λ)	(0,5λ)	(0,25λ)
SOLUCION		B	C	D	C (SPIKE)	D	E	F	G

La prueba se realizó por duplicado sobre cada una de las cuatro concentraciones estándar incluyendo los controles negativos. Se mezcló un volumen de reactivo LAL (0,1 mL) con un volumen igual de una de las soluciones en cada tubo LAL. Se colocó en un baño de agua la mezcla de reacción durante 60 ± 2 min a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, evitando vibraciones. Para analizar la integridad del gel sacar uno a uno los tubos directamente de incubación y para la lectura inclinar suavemente con un ángulo de 30° hasta invertir suavemente el tubo. Si se forma un gel firme que permanece en su lugar después de invertir el tubo, se registró el resultado como positivo. Un resultado fue negativo si no existe formación de gel con esas características. La prueba no fue válida a menos que la concentración más baja de las soluciones estándar muestre un resultado negativo en todas las pruebas repetidas. El punto final es la última dilución positiva en la serie de concentraciones decrecientes de endotoxina que coagula. También se puede definir como la mayor dilución que da resultado positivo. El punto final estuvo seguido por una dilución de resultado negativo. Se Calculó

el valor medio de los logaritmos de la concentración en el punto final y luego el antilogaritmo del valor medio usando la siguiente ecuación:

Media Geométrica de la concentración del punto final = Antilog. $(\sum e / f)$

Donde $\sum e$ es la suma de los logaritmos de las concentraciones de punto final en la serie de dilución utilizada, y f es el número de tubos de ensayo repetidos. La media geométrica de la concentración del punto fue la sensibilidad medida del reactivo LAL (en $\text{UE} \cdot \text{mL}^{-1}$). El rango para la sensibilidad de un reactivo de $0,03 \text{ UE} \cdot \text{mL}^{-1}$ es aceptable, si no es menor de $0,5 \lambda$ y no es mayor de 2λ , a partir de ello se confirma la sensibilidad declarada en la etiqueta y se procede a utilizar en pruebas realizadas con este lisado. Es necesario contar con una concentración de endotoxinas para llevar a cabo las pruebas de inhibición y magnificación que nos confirme la interferencia de la prueba, ésta solución se conoce como spike. El spike, es una solución de endotoxinas que tiene una concentración, en la cual, cuando se agrega un volumen menor al 10% del volumen final de la

muestra, se obtiene una concentración de 2λ .

Determinación de la máxima dilución válida (USP 2012abc):

Se calculó dividiendo el límite de endotoxinas por la sensibilidad λ declarada en la etiqueta del reactivo LAL utilizado (0,03).

$$MVD = \frac{\text{Limite de endotoxina}}{\lambda}$$

El límite de endotoxinas permitido según USP del producto a analizar fue de 20 UE/ dispositivo. En el líquido de extracción se calculó el límite de endotoxinas permitido por la siguiente fórmula:

$$(K \times N) / (V)$$

Donde K es la cantidad de endotoxina permitida por equipo, N es el número de equipos que se analizan, V es el volumen total del extracto.

Prueba de Factores de interferencia para el método gel - clot - pruebas de inhibición y de potenciación: Se realizó la preparación de las soluciones A^a, B^b, C^c, D^d como se muestra en la tabla 13 y se procedió a realizar la prueba de inhibición potenciación en las soluciones de muestra de una dilución menor que la MVD que no contenga endotoxinas detectables siguiendo el procedimiento indicado antes en la prueba de confirmación de sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo LAL. La media geométrica

de las concentraciones del punto final de las soluciones B y C se determinó la ecuación de esa prueba. Se mezcló un volumen de reactivo LAL (0,1 mL) con un volumen igual de una de las soluciones en cada tubo LAL. Se colocó en un baño de agua la mezcla de reacción durante 60 ± 2 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, evitando vibraciones. Para analizar la integridad del gel se sacó uno a uno los Tubos directamente de incubación y con un único movimiento suave, y se invirtieron aproximadamente 180° . Si se forma un gel firme que permanece en su lugar después de invertir los tubos, se registró el resultado como positivo. Un resultado es negativo si no se forma un gel con esas características. La media geométrica de las concentraciones del punto final se determinó empleando la anterior ecuación.

Esta prueba se repitió cuando cambia cualquier condición que pueda influir sobre los resultados de la misma. La prueba no fue válida a menos que la solución de muestra de la preparación en análisis que está exenta de endotoxinas detectables y el control negativo de agua reactivo LAL no muestre ninguna reacción y el resultado de la prueba de confirmación de la sensibilidad declarada en la etiqueta. Si la sensibilidad del lisado determinada en presencia de la solución de muestra en el análisis de las soluciones B de la tabla 13 no es menor de $0,5\lambda$ y no es mayor de 2λ , la solución de la muestra no contiene factores que interfieran en las condiciones experimentales utilizadas.

En caso contrario la solución de muestra que se examinó interfiere con la prueba. Si la muestra en análisis no cumple con la prueba a una dilución

menor que la MVD, se repitió la prueba empleando una dilución mayor que no exceda la MVD.

Tabla 13. Diluciones para la prueba de factores de interferencia para el método gel-clot - Pruebas de inhibición y de potenciación de la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Solucion	Concentracion de endotoxina/ solucion a la que se agrega la endotoxina	Diluyente	Factor de dilucion	Concentracion inicial de Endotoxina	Numero de repeticiones
A ^a	ninguna /solucion de muestra	-----	-----	-----	4
		solucion	1	2λ	4
B ^b	2λ /solucion de muestra	de	2	1λ	4
		muestra	4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
		Agua	1	2λ	2
C ^c	2λ /agua para LAL	reactivo	2	1λ	2
		para	4	0,5λ	2
		LAL	8	0,25λ	2
D ^d	ninguna /agua reactivo para LAL	-----	-----	-----	2

De la solución B con respecto a la tabla 13, prepararlo según Tabla 14.

Tabla 14. Diluciones para la preparación de la solución B para la prueba de factores de interferencia para el método gel-clot - pruebas de inhibición y de potenciación de la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

SPIKE(10 veces 2λ) (C) 0,6 EU/mL	100μL	500μLα	500μL β	500μL γ
MVD del producto	900μL	500μL	500μL	500μL
Concentración	0,06 EU/mL	0,03 EU/mL	0,015 EU/mL	0,0075 EU/mL
	α (2λ)	β (1λ)	γ (0,5λ)	δ (0,25λ)

Prueba de Límite de Coagulación:

Se preparó las soluciones según la tabla 15. La solución A y la solución B de control positivo del producto se preparó utilizando una dilución no mayor que la del MVD. Las soluciones B y C de control positivo contienen la

preparación de la endotoxina estándar en una concentración que corresponde al doble de la sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo LAL. La solución D de control negativo fue agua reactiva para LAL.

Tabla 15. Diluciones para la prueba de límite de coagulación de la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Solución	Concentración de endotoxina/ Solución a la que se agrega endotoxina	Numero de Repeticiones
A	ninguna/ solución de muestra diluida	2
B	2λ/ solución de muestra diluida	2
C	2λ/Agua reactivo para LAL	2
D	ninguna/ Agua reactivo para LAL	2

Se mezcló un volumen de reactivo LAL (0,1 mL) con un volumen igual de una de las soluciones en cada tubo LAL. Se colocó en un baño de agua la mezcla de reacción durante 60 ± 2 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, evitando vibraciones. Para analizar la integridad del gel se sacó uno a uno los tubos directamente de incubación y con un único movimiento suave, se invirtió aproximadamente 180° . Si se formó un gel firme que permanece en su lugar después de invertir los tubos, se registró el resultado como positivo. Un resultado fue negativo si no se formó un gel con esas características. La prueba no fue válida a menos que ambas determinaciones repetidas de las soluciones B y C de control positivo son positivas y la solución D de control

negativo sea negativa. La preparación en análisis cumple con la prueba si se obtienen un resultado negativo en ambos tubos que contienen la solución A. Se repitió la prueba cuando se obtuvo un resultado positivo en un tubo que contenga solución A y un resultado negativo en el otro. La preparación de análisis cumple con la prueba cuando se obtuvo un resultado negativo en ambos tubos que contienen la solución A en el resultado de la repetición.

Método gel-clot: Se preparó las soluciones A, B, C, y D como se indica en la tabla 16. Se mezcló un volumen de reactivo LAL (0,1 mL) con un volumen igual de una de las soluciones en cada tubo LAL. Se colocó en un baño de

agua la mezcla de reacción durante 60 ± 2 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, evitando vibraciones. Para analizar la integridad del gel se sacó uno a uno los tubos directamente de incubación y con un único movimiento suave, se invirtieron

aproximadamente 180° . Si se formó un gel firme que permanece en su lugar después de invertir los tubos, se registró el resultado como positivo. Un resultado fue negativo si no se formó un gel con esas características.

Tabla 16. Diluciones para el método gel-clot para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Solución	Concentración de endotoxina/ solución a la que se agrega la endotoxina	Diluyente	Factor de dilución	Concentración inicial de Endotoxina	Numero de repeticiones
1	ninguna /solución de muestra	Agua reactivo para LAL	1	---	2
			2	---	2
			4	---	2
			8	---	2
2	2λ /solución de muestra	---	1	2λ	2
3	2λ /Agua reactivo para LAL	Agua reactivo para LAL	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	$0,5\lambda$	2
			8	$0,25\lambda$	2
4	ninguna /Agua reactivo para LAL	---	---	---	2

Solución 1: La solución de la muestra en análisis a la dilución que no exceda la MVD. Las diluciones subsiguientes no deben de exceder la MVD. Se usó agua reactiva para LAL para hacer series de diluciones de 4 tubos que contenga la solución de muestras en análisis a concentraciones de 1, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, y $\frac{1}{8}$ con respecto a la dilución usada.

Solución 2: La solución A que contenga endotoxina estándar a una concentración de 2λ (control positivo).

Solución 3: Dos series de 4 tubos de agua reactiva LAL que contenga la endotoxina estándar a una concentración de 2λ , 1λ , $0,5\lambda$, $0,25\lambda$ respectivamente.

Solución 4: Agua reactivo para LAL (control negativo).

Para la preparación de los extractos de la muestra y obtener la solución para realizar las diluciones proceder con lo descrito en la tabla 17, según corresponda:

Para piezas pequeñas: Se realizó

la extracción de 3 muestras en 100 mL de agua de inyección estéril para extracción y evaluación, se aplicó la fórmula descrita anteriormente para calcular el límite de endotoxinas en el líquido de extracción, y luego la MVD:

$$\frac{20 \text{ EU} \cdot \text{equipo}^{-1} \times 3 \text{ equipo}}{100 \text{ mL}} = 0,6 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$\text{MVD} = \frac{0,6 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}}{0,03 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}} = 8$$

Tabla 17. Diluciones del líquido de extracción para hallar el MVD de la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

	3 muestras	2mL	2mL a	2mL b	2mL c
Agua LAL	100mL	5mL	4mL	4mL	4mL
Concentracion (EU/mL)		0,24 a	0,12 b	0,06 c	0,03 d
solucion a concentracion de MVD		1/8	1/4	1/2	1

Aspectos éticos: Los autores declaran que se cumplió con toda la normatividad ética nacional e internacional.

RESULTADOS

CALIFICACIÓN DEL HORNO ESTERILIZADOR

CALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN DEL HORNO ESTERILIZADOR

Instalación. Conexiones útiles: El horno esterilizador HE-004 se encontró instalado en el área de equipos del Área de Microbiología. Temperatura ambiental: Máximo 25°C. Temperatura promedio: 21,5°C.

Suministro de energía eléctrica: Según los requisitos eléctricos recomendados por el fabricante del equipo Horno Esterilizador HE-004

(como se indica en la tabla 18), se comprobó que el horno estuviera conectado a una fuente de energía eléctrica y cumpliera con las siguientes características:

Tabla 18. Requisitos eléctricos recomendados por el fabricante.

Características	Conformidad
Fases	Monofásico
Conexión a tierra	Conforme
Conductores Tipo	Aislante vulcanizado
Protección	IP 20

Características del horno esterilizador: El horno esterilizador, código interno HE-004, estuvo conformado por una carcasa exterior y una cámara interna de trabajo de acero inoxidable, la cual se caracterizó por su gran estabilidad, propiedades higiénicas óptimas y resistencia a la corrosión. Puerta exterior de acero inoxidable, el cierre fue hermético

para evitar la pérdida de calor. El calentamiento se efectuó por medio de las resistencias que se encuentran en las paredes internas de la cámara, la irradiación fue por convección natural del aire. El aire fresco que entra, se calienta en la cámara de calentamiento a su vez entra a través de las ranuras de aire de la pared lateral de la

cámara de interior. La turbina de aire en la pared posterior de la cámara interior produjo en comparación con la convección natural, un cambio mayor de aire y una mayor circulación forzada horizontal. La trampilla de aire en la pared posterior del equipo se ajustó a la cantidad de aire que entra y sale (Tabla 19).

Tabla 19. Características del horno esterilizador.

Características	Conformidad
Marca	MEMMERT
Modelo	UNE 500
N° de serie	C506-0691
Código interno	HE-004
Temperatura de trabajo	250 ±5 °C
Alcance de indicación	20 °C a 300 °C
Voltaje	230 V/8.7 ^a
Frecuencia	50/60 Hz
Potencia	2000 watts
Volumen interior	108 L
Anchura de la cámara interior A	560 mm
Altura de la cámara interior B	480 mm
Fondo de la cámara interior C	400 mm
Anchura exterior D	710 mm
Altura exterior E	760 mm
Fondo exterior F	550 mm
Peso	50 Kg
Carga máximo por bandeja	30 Kg
Carga máximo total por estufa	50 Kg
Temperatura ambientales	Temperatura entre 5°C y 40°C

Características del horno esterilizador.

Manejo de la puerta: La puerta se abrió tirando del pomo de la puerta. Se cerró presionando hacia dentro el pomo de la puerta.

Prendido y apagado del equipo ON/OFF: Equipo apagado: El mando giratorio pulsador estuvo encastrado

dentro del panel y así protegido contra daños. Equipo prendido: El mando giratorio pulsador estuvo desencastrado fuera del panel y se pudo manejar mediante el mando giratorio y la tecla set.

Ajustar el cambio de aire: Moviendo la regleta de aire se abrió y cerró la trampilla, ajustándose de ésta manera la cantidad de aire que entra y sale.

Ajustar la temperatura: Se mantuvo presionada la tecla set y se ajustó con el mando giratorio pulsador, la temperatura nominal deseada.

Vigilancia electrónica de temperatura: El rango de ajuste fue hasta 10°C como máximo por encima de la temperatura máxima de la estufa.

Vigilancia electrónica de temperatura: El equipo cuenta con un limitador mecánico de temperatura. En el caso que fallara la unidad de protección electrónica y que se excediera la temperatura máxima en unos 20°C, el limitador de temperatura actuaría como única medida de protección desconectando la calefacción.

Limpieza: Verificación de la limpieza del Horno Esterilizador HE-004 de acuerdo al instructivo I-MIC.07. Manejo del Horno esterilizador MEMMERT HE-004. Vigente hasta agosto 2013.

CALIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL HORNO ESTERILIZADOR

Procedimiento operativo estándar.

Procedimiento de manejo y limpieza del horno esterilizador HE-004.

Procedimiento : I-MIC.07

Vigencia : Hasta marzo 2013

Variables a verificar del proceso.

Descripción del manejo y uso: Se encendió el equipo presionando el mando giratorio permitiendo que éste salga. Se ajustó el cambio de aire a condiciones deseadas moviendo la re-

gleta de aire hacia la izquierda para cerrar y hacia la derecha para abrir. Para la programación de la temperatura, se mantuvo la tecla SET presionada y se ajustó con el mando giratorio, girando hacia la derecha para su aumento y a la izquierda para su disminución a la temperatura nominal deseada. Después de soltar la tecla SET, el equipo siguió indicando de forma parpadeante, durante largo rato, la temperatura nominal. Después indica la temperatura real del momento, el regulador comenzó a calentar hasta alcanzar la temperatura nominal programada. Por último se cerró la puerta del equipo.

Variables claves del uso del horno esterilizador.

Temperatura. Tiempo. Energía eléctrica. Condición ambiental.

Equipos necesarios para realizar las pruebas.

Horno Esterilizador

Equipo : Horno Esterilizador

Vigencia : Hasta marzo 2013

Marca : MEMMERT

Modelo : UNE 500

Localización : Área de Microbiología

Código interno : HE-004

Calibración de los instrumentos del equipo.

Comprobación de los controles:

Se demostró que los controles del horno esterilizador operan como se especifican. Secuencia de encendido y apagado. Funcionamiento el switch de encendido y apagado. Luz indicadora de calentamiento: Funciona correcta-

mente la luz indicadora de funcionamiento de las resistencias.

Control de Temperatura: El controlador permitió alcanzar y mantener la temperatura programada.

Verificar que el equipo ha sido calibrado.

Fecha de calibración: 05/03/2012.

Próxima calibración: 04/03/2013.

Proceso de operación.

Distribución de calor sin carga 250°C ± 5°C: Con el horno esterilizador vacío, se simuló las condiciones del proceso real de despirogenización, operando dentro de los parámetros establecidos.

Especificaciones de operación.

La temperatura alcanzada estuvo dentro del rango de temperatura programada 250°C ± 5°C.

Número de operaciones: 3 operaciones sin carga.

Objetivo: Se realizó una simulación del proceso de incubación sin carga colocando en cada punto de calibración el sensor de temperatura.

Procedimiento.

Se encendió el equipo Horno Esterilizador HE-004 de acuerdo al instructivo I-MIC.07 Manejo y limpieza del horno esterilizador. Con la tecla set apretada se giró el mando giratorio/pulsador y seleccionar la temperatura de 250°C en los casos la prueba lo requiera de acuerdo a la especificación.

De acuerdo a la calibración realizada al horno esterilizador HE-004, se tomó como referencia los 10 puntos de calibración, 5 puntos en la parte superior y 5 puntos en la parte inferior, en los cuales se colocan los sensores de temperatura en cada punto.

Posiciones de los sensores de Temperatura. Las posiciones 1 y 6 se ubicaron sobre el centro de sus respectivos niveles. La posición 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 se ubicaron 9,0 cm de la pared lateral a 7,0 cm frente al equipo y 7,0 cm de la pared superior. Frecuencia de toma de datos de los sensores de temperatura. 1 dato de temperatura por 120 seg.

Temperatura de calificación 250°C. Primer proceso de operación sin carga.

Prueba de distribución N°1: Seguir los pasos de descripción del manejo y uso. Realizado por la Empresa Kossodo. Temperatura ambiental: 24,8°C. Humedad ambiental: 42 %. Hora inicio: 13h 58min. Hora final: 14h 58min.

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 1. Temperatura promedio: 250,4°C. Temperatura máxima: 254,7°C. Temperatura mínima: 246,5°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 250°C ±5°C.

Segundo proceso de Operación sin carga.

Prueba de Distribución N° 2: Se siguió los pasos de descripción del manejo y uso. Realizado por la Empresa Kossodo. Temperatura ambiental: 24,4°C. Humedad ambiental: 46. Hora inicio: 14h 00min. Hora final: 15h 00min.

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 1. Temperatura promedio: 250,8°C. Temperatura máxima: 254,8°C. Temperatura mínimo: 246,5°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 250°C ±5°C.

Tercero proceso de Operación sin carga.

Prueba de Distribución N° 3: Se siguió los pasos de descripción del manejo y uso. Realizado por la Empresa Kossodo. Temperatura ambiental: 24,8°C. Humedad ambiental: 48 %. Hora inicio: 17h 59min. Hora final: 18h 59min.

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 1. Temperatura promedio: 250,9°C. Temperatura máxima: 254,9°C. Temperatura mínimo: 246,5°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 250°C±5°C.

CALIFICACIÓN DE DESEMPEÑO DEL HORNO ESTERILIZADOR

Productos que se colocan en el horno esterilizador: Despirogenización a 250°C. Pipetas, tubos de ensayo, papel aluminio, vaso de precipitación, tijeras y pinzas.

Variables claves del proceso de Incubación: Temperatura. Condición ambiental. Tiempo.

Equipos necesarios para realizar las pruebas.

Equipo: Horno Esterilizador

Marca: MEMMERT

Fecha de calibración: UNE 500

Vigencia de calibración: Área de Microbiología

Distribución de calor con carga

250°C±5°C: El equipo se cargó con material descrito a contaminación. 34 tubos de ensayo en paquetes de 4 y 5 unidades. 16 pipetas. 3 vasos de precipitación de 1 L. Los materiales se envolvieron con papel aluminio. Especificaciones de operación. La temperatura alcanzada estuvo dentro del rango de temperatura programada: 250°C ±5°C. En las pruebas, los sensores de temperatura se colocaron dentro de los tubos y vasos de precipitación. Número de operaciones: 3 operaciones con carga.

Objetivo: Se determinó la temperatura de trabajo del equipo en cada punto de acuerdo al certificado de calibración bajo condiciones reales. Se siguió los pasos del procedimiento de

manejo y la ubicación de los sensores de temperatura para la calificación de desempeño.

Temperatura de calificación 250°C.

Primer proceso de operación con carga.

Prueba de penetración N°1: Se siguió los pasos del Descripción del Manejo y Uso. Realizado por la Empresa Kossodo. Temperatura ambiental: 24,9°C. Humedad ambiental: 45 %. Hora inicio: 10h 56min. Hora final: 11h 56min.

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 1. El punto más caliente corresponde al punto 8. Temperatura promedio: 250,5°C. Temperatura máxima: 254,4°C. Temperatura mínimo: 245,8°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 250°C ±5°C.

Segundo proceso de operación con carga.

Prueba de penetración N°2: Se siguió los pasos del Descripción del Manejo y Uso. Realizado por la Empresa Kossodo. Temperatura ambiental: 24,8°C. Humedad ambiental: 49 %. Hora inicio: 17h 04min. Hora final: 18h 04min.

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10. Los puntos más

fríos correspondieron a los puntos 4 y 5. El punto más caliente correspondió al punto 6. Temperatura promedio: 250,9°C. Temperatura máxima: 255,0°C. Temperatura mínimo: 245,1°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 250°C ±5°C.

Tercer proceso de operación con carga.

Prueba de penetración N°3: Se siguió los pasos de la descripción del Manejo y Uso. Realizado por la Empresa Kossodo. Temperatura ambiental: 24,8°C. Humedad ambiental: 49 %. Hora inicio: 10h 22min. Hora final: 11h 26min

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 4. El punto más caliente correspondió al punto 8. Temperatura promedio: 250,9°C. Temperatura máxima: 254,9°C. Temperatura mínimo: 245,1°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 250°C ±5°C.

CALIFICACIÓN DEL BAÑO DE AGUA

CALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN DEL BAÑO DE AGUA

Conexiones útiles.

Instalación: El Baño de Agua BM-005 se encontró instalado en el área de Recuento Microbiano – LAL de Microbiología. Temperatura ambiental:

Máximo 25°C. Temperatura promedio: 21,5°C.

Suministro de energía eléctrica:

Según los requisitos eléctricos recomendados por el fabricante del equipo baño de agua BM-005 (como se indica en la tabla 20), se comprobó que el horno estuviera conectado a una fuente de energía eléctrica y cumpliera con las siguientes características:

Tabla 20. Requisitos eléctricos recomendados por el fabricante.

Características	Conformidad
Fases	Monofásico
Conexión a tierra	Conforme
Conductores Tipo	Aislante vulcanizado
Protección	IP 20

Características del baño de agua.

El baño de agua, código interno BM-005, estuvo conformada por una

carcasa exterior y una cámara interna de trabajo de acero inoxidable, la cual se caracteriza por su gran estabilidad, propiedades higiénicas óptimas y resistencia a la corrosión. Puerta exterior de acero inoxidable, el cierre fue hermético para evitar la pérdida de calor. El calentamiento se efectuó por medio de las resistencias que se encuentran en las paredes internas de la cámara, la irradiación fue por convección natural del aire. El aire fresco que entró, se calienta en la cámara de calentamiento a su vez entra a través de las ranuras de aire de la pared lateral de la cámara de interior. La turbina de aire en la pared posterior de la cámara interior produjo en comparación con la convección natural, un cambio mayor de aire y una mayor circulación forzada horizontal. La trampilla de aire en la pared posterior del equipo se ajustó a la cantidad de aire que entra y sale.

Tabla 21. Características del baño de agua.

Características	Conformidad
Marca	MEMMERT
Modelo	WNE14
N° de serie	L407.0499
Código interno	BM-005
Temperatura de trabajo	37 +/-1 °C
Alcance de indicación	10 °C a 95 °C
Voltaje	230 V
Frecuencia	50/60 Hz
Potencia	1800 watts
Volumen interior	14 L
Anchura de la cámara interior A	350 mm.
Altura de la cámara interior B	290 mm.
Fondo de la cámara interior C	140 mm.
Anchura exterior D	578 mm.
Altura exterior E	436 mm.
Fondo exterior F	337 mm.
Peso	16 Kg
Carga máximo por bandeja	30 Kg
Carga máximo total por estufa	50 Kg
Temperatura ambientales	Temperatura entre 5°C y 40°C

Características del baño de agua.

Manejo de la puerta: La puerta se abrió tirando del pomo de la puerta. Se cerró presionando hacia dentro el pomo de la puerta.

Prendido y apagado del equipo ON/OFF: Equipo apagado: El mando giratorio pulsador estuvo encastrado dentro del panel y así protegido contra daños. Equipo prendido: El mando giratorio pulsador estuvo desencastrado fuera del panel y se manejó mediante el mando giratorio y la tecla set.

Selección de parámetros: Girando el mando giratorio/pulsador, se seleccionó un parámetro. El parámetro se-

leccionado parpadea con luz clara de manera que pudiera ajustarse, con la tecla set apretada por medio del mando giratorio y pulsador.

Ajustar la temperatura: Se giró el mando giratorio/pulsador hasta que parpadea el símbolo °C. La temperatura teórica puede ajustarse con tecla set accionada. Seguidamente muestra la temperatura que se asignó de forma parpadeante. Después se indicó la temperatura real del momento y el regulador empezó a calentar hasta alcanzar la temperatura teórica.

Dispositivos de seguridad: Presentó un limitador de temperatura mecánico, termostato de seguridad

mecánico limitador de temperatura, si durante el funcionamiento falló la unidad de regulación electrónica y se sobrepasó en aproximadamente 30 °C la temperatura máxima preajustada desde fábrica, como última medida de seguridad, el limitador de temperatura se desconectó de manera permanente el calentador.

Protección de marcha en seco:

El limitador de temperatura mecánico junto a la función de protección contra sobre "temperatura" tiene la función de protección contra marcha en seco, es decir, la calefacción se desconectó de modo permanente si se desciende por debajo de un determinado nivel de líquido.

Limpieza: Verificación de la limpieza del Baño de Agua BM-005 de acuerdo al instructivo I-MIC.09. Manejo y del Baño de Agua BM-005 vigente hasta agosto 2013.

CALIFICACIÓN DE OPERACIÓN DEL BAÑO DE AGUA

Procedimiento operativo estándar.
Procedimiento de manejo y limpieza del baño de agua BM-005

Procedimiento : I-MIC.09
 Vigencia : Hasta marzo 2013

Variables a verificar del proceso.

Descripción del manejo y uso:

Para encender el equipo se presionó el mando giratorio permitiendo que éste salga. Para la programación de la tem-

peratura se rotó el botón del mando giratorio hasta que el símbolo de °C se muestre, se mantuvo la tecla SET presionada y se ajustó con el mando giratorio, girando hacia la derecha para su aumento y a la izquierda para su disminución a la temperatura nominal deseada. Después de soltar la tecla SET, el equipo siguió indicando de forma parpadeante, durante largo rato, la temperatura nominal. Después indica la temperatura real del momento y el regulador comenzó a calentar hasta alcanzar la temperatura nominal programada. Por último se cerró la puerta del equipo.

Variables claves del uso del horno esterilizador: Temperatura. Tiempo. Energía eléctrica. Condición ambiental.

Equipos necesarios para realizar las pruebas.

Equipo : Baño de Agua
 Vigencia : Hasta marzo 2013
 Marca : MEMMERT
 Modelo : WNE 14
 Localización : Área de Microbiología
 Código interno : BM-005

Calibración de los instrumentos del equipo.

Comprobación de los controles:

Se demostró que los controles del baño de agua operan como se especifican. Mando giratorio/pulsador de encendido y apagado. Funcionamiento del mando giratorio pulsador para el encendido y apagado. Luz indicadora de calentamiento. Funcionamiento co-

recto de la luz indicadora de funcionamiento de las resistencias.

Control de temperatura: El controlador permitió alcanzar y mantener la temperatura programada. Se verificó que el equipo ha sido calibrado. Fecha de calibración: 05/03/2012. Próxima calibración : 04/03/2013

Proceso de operación.

Distribución de calor sin carga: Con el baño de agua vacío, se simuló las condiciones del proceso real de incubación, operando dentro de los parámetros establecidos.

Especificaciones de operación.

La temperatura alcanzada estuvo dentro del rango de temperatura programada $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Número de operaciones: 3 operaciones sin carga.

Objetivo: Se realizó una simulación del proceso de incubación sin carga colocando en cada punto de calibración el sensor de temperatura.

Procedimiento: Se encendió el equipo de acuerdo al instructivo I-MIC.09 Se manejó del baño de agua. Con la tecla set apretada se giró el mando giratorio/pulsador y se seleccionó la temperatura de 37°C en los casos la prueba lo requiera de acuerdo a la especificación. De acuerdo a la calibración realizada al baño de agua BM-005, se tomó como referencia los 10 puntos de calibración, 5 puntos en la parte superior y 5 puntos en la parte inferior, en los cuales se

colocaron los sensores de temperatura en cada punto.

Posiciones de los sensores de Temperatura: Las posiciones 1 y 6 se ubicaron sobre el centro de sus respectivos niveles. La posición 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 se ubicaron 3,0 cm de la pared lateral a 4,0 cm frente al equipo y 2,0 cm de la pared superior. Frecuencia de toma de datos de los sensores de temperatura. 1 dato de temperatura por 120 seg.

Temperatura de calificación 37°C .

Primer proceso de operación sin carga.

Prueba de distribución N° 1: Se siguió los pasos del descripción del manejo y uso. Realizado por la Empresa Kossodo. Temperatura ambiental: $24,8^{\circ}\text{C}$. Humedad ambiental: 42 %. Hora inicio: 08h 06min. Hora final: 09h 36min.

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 5. Temperatura promedio: $37,2^{\circ}\text{C}$. Temperatura máxima: $37,6^{\circ}\text{C}$. Temperatura mínimo: $36,9^{\circ}\text{C}$. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Segundo proceso de operación sin carga.

Prueba de distribución N° 2: Se siguió los pasos de descripción del manejo y uso. Realizado por la Empresa Kossodo. Temperatura ambiental:

24,8°C. Humedad ambiental: 49 %.
Hora inicio: 11h 05min. Hora final:
12h 35min

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 5. Temperatura promedio: 37,2°C. Temperatura máxima: 37,7°C. Temperatura mínimo: 36,8°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 37°C ±1°C.

Tercero proceso de operación sin carga.

Prueba de distribución N° 3: Se siguió los pasos de descripción del manejo y uso. Realizado por la Empresa Kossodo. Temperatura ambiental: 24,8°C. Humedad ambiental: 48 %. Hora inicio: 10h 16min. Hora final: 11h 46min

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 2. Temperatura promedio: 37,3°C. Temperatura máxima: 37,6°C. Temperatura mínimo: 37,0°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 37°C ±1°C.

CALIFICACIÓN DE DESEMPEÑO DEL BAÑO DE AGUA

Productos que se colocan en el baño de agua: Tubos que contienen agua LAL, Pyrotell, Concentración estándar de endotoxinas, agua de inyección estéril y la extracción de la muestra. Gradillas.

Variables claves del proceso de incubación: Temperatura. Condición ambiental. Tiempo.

Equipos y materiales necesarios para realizar las pruebas.

Equipos.

Equipo : horno esterilizador
Marca : MEMMERT
Fecha de calibración: UNE 500

Materiales: Tubos LAL, gradilla y agua de inyección estéril.

Proceso de operación.

Distribución de calor con carga: El equipo se cargó con material descrito a continuación. 12 tubos LAL en una gradilla.

Especificaciones de operación. La temperatura alcanzada estuvieron dentro del rango de temperatura programada: 37°C ±1°C. En las pruebas, los sensores de temperatura se colocaron dentro de los tubos LAL.

Número de operaciones: 3 operaciones con carga.

Objetivo: Se determinó la temperatura de trabajo del equipo en cada punto de acuerdo al certificado de calibración bajo condiciones reales. Se siguió los pasos del punto según el procedimiento de manejo y la ubicación de los sensores de temperatura para la calificación de desempeño.

Temperatura de calificación 37°C.

Primer proceso de operación con carga.

Prueba de penetración N°1: Se siguió los pasos de descripción del manejo y uso. Realizado por la Empresa Kossodo.

Temperatura ambiental: 24,8°C. Humedad ambiental: 42 %. Hora inicio: 09h 04min. Hora final: 10h 34min

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 1. Temperatura promedio: 37,3°C. Temperatura máxima: 37,7°C. Temperatura mínimo: 37,0°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 37°C ±1°C.

Segundo proceso de operación con carga.

Prueba de penetración N°2: Se siguió los pasos de descripción del manejo

y uso. Realizado por la Empresa Kossodo.

Temperatura ambiental: 24,8°C. Humedad ambiental: 49 %. Hora inicio: 13h 16min. Hora final: 14h 46min.

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10. El punto más frío correspondió al punto 5. Los puntos más calientes correspondieron a los puntos 1 y 4. Temperatura promedio: 37,4°C. Temperatura máxima: 38,0°C. Temperatura mínimo: 36,9°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 37°C ±1°C.

Tercer proceso de operación con carga.

Prueba de penetración N°3: Se siguió los pasos de descripción del manejo y uso. Realizado por la Empresa Kossodo.

Temperatura ambiental: 24,8°C. Humedad ambiental: 49 %. Hora inicio: 09h 21min. Hora final: 10h 51min.

Conclusión: Los puntos que presentaron temperatura uniforme son 1, 3, 5, 7, 8, 9. Los puntos más calientes corresponden a los puntos 2, 6, 10. El punto más caliente correspondió al punto 4. Temperatura promedio: 37,4°C. Temperatura máxima: 38,0°C. Temperatura mínimo: 36,9°C. Los resultados de la temperatura cumplieron con la temperatura de trabajo que se requiere para el uso del equipo: 37°C ±1°C.

DESARROLLO DEL PROCESO DE DESPIROGENIZACIÓN

EN EL CICLO DE DESPIROGENIZACIÓN.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ENDOTOXINAS POR EL MÉTODO DE LAL Y DE LA REDUCCION LOGARÍTMICA OBTENIDA

La Tabla 22 indica el primer ensayo de exposición de viales de indicadores de endotoxinas para validar el proceso de despirogenización.

Tabla 22. Primer ensayo de exposición de viales de indicadores de endotoxinas para validar el proceso de despirogenización.

DILUCIONES	1/10	1/100	1/1000	1/10 000
Punto N°1	(-)	(-)	(-)	(-)
Punto N°4	(-)	(-)	(-)	(-)
Punto N°5	(-)	(-)	(-)	(-)
Control positivo	(+)	(+)	(+)	(+)
Control positivo	(+)	(+)	(+)	(+)
Control negativo (agua LAL)	(-)	(-)		

CÁLCULOS.

Punto final del vial control positivo:
 Log de 10,000 EU = 4
 Punto final del vial expuesto: Log de 0,03EU = - 1,522

El ciclo de Despirogenización reduce más de 3 logaritmos cumpliendo con la especificación indicada.

Resultado: Conforme.

Sustracción:

Reducción Logarítmica: log
 10,000EU/mL - log 0,03EU
 = 4 - (-1,522)
 = 5,522
 = 5,522 = > 3 Logaritmos

La Tabla 23 indica el segundo ensayo de exposición de viales de indicadores de endotoxinas para validar el proceso de despirogenización.

Tabla 23. Segundo ensayo de exposición de viales de indicadores de endotoxinas para validar el proceso de despirogenización.

DILUCIONES	1/10	1/100	1/1000	1/10 000
Punto N°1	(-)	(-)	(-)	(-)
Punto N°4	(-)	(-)	(-)	(-)
Punto N°5	(-)	(-)	(-)	(-)
Control positivo	(+)	(+)	(+)	(+)
Control positivo	(+)	(+)	(+)	(+)
Control negativo (agua LAL)	(-)	(-)		

CÁLCULOS.

Punto final del vial control positivo:
Log de 10,000 EU = 4

Punto final del vial expuesto: Log de
0,03EU = - 1,522

Sustracción:

Reducción Logarítmica: \log
10,000EU/mL - \log 0,03EU
= 4 - (-1,522)

$$= 5,522$$

$$= 5,522 = > 3 \text{ Logaritmos}$$

El ciclo de despirogenización reduce más de 3 logaritmos cumpliendo con la especificación indicada.

Resultado: Conforme.

La Tabla 24 indica el tercer ensayo de exposición de viales de indicadores de endotoxinas para validar el proceso de despirogenización.

Tabla 24. Tercer ensayo de exposición de viales de indicadores de endotoxinas para validar el proceso de despirogenización.

DILUCIONES	1/10	1/100	1/1000	1/10 000
Punto N°1	(-)	(-)	(-)	(-)
Punto N°4	(-)	(-)	(-)	(-)
Punto N°5	(-)	(-)	(-)	(-)
Control positivo	(+)	(+)	(+)	(+)
Control positivo	(+)	(+)	(+)	(+)
Control negativo (Agua LAL)	(-)	(-)		

CÁLCULOS.

Punto final del vial control positivo:
Log de 10,000 EU = 4

Punto final del vial expuesto: Log de
0,03EU = - 1,522

Sustracción:

$$\begin{aligned} & \text{Reducción Logarítmica: } \log \\ & 10,000\text{EU/mL} - \log 0,03\text{EU} \\ & = 4 - (-1,522) \\ & = 5,522 \\ & = 5,522 = > 3 \text{ Logaritmos} \end{aligned}$$

El ciclo de Despirogenización reduce más de 3 logaritmos cumpliendo con la especificación indicada.

Resultado: Conforme.

DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS-MÉTODO GEL-CLOT.

PRUEBA DE CONFIRMACIÓN DE SENSIBILIDAD DECLARADA EN LA ETIQUETA EL REACTIVO LAL.

La Tabla 25 indica el primer ensayo de confirmación de sensibilidad declarada en etiqueta del reactivo LAL para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 25. Primer ensayo de confirmación de sensibilidad declarada en etiqueta del reactivo LAL para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBOS	CONCENTRACIÓN ESTANDAR DE ENDOTOXINAS				AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTÉRIL
	2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	Control (-)	Control (-)
1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

La Tabla 26 indica el segundo ensayo de confirmación de sensibilidad declarada en etiqueta del reactivo LAL

para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 26. Segundo ensayo de confirmación de sensibilidad declarada en etiqueta del reactivo LAL para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBOS	CONCENTRACIÓN ESTANDAR DE ENDOTOXINAS				AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTÉRIL
	2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	Control (-)	Control (-)
1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

La Tabla 27 indica el tercer ensayo para la validación de la prueba de confirmación de sensibilidad de endotoxinas bacterianas. declarada en etiqueta del reactivo LAL

Tabla 27. Tercer ensayo de confirmación de sensibilidad declarada en etiqueta del reactivo LAL para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBOS	CONCENTRACIÓN ESTANDAR DE ENDOTOXINAS				AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTÉRIL
	2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	Control (-)	Control (-)
1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

La Tabla 28 indica el cálculo de la media geométrica (GM) para confirmar la sensibilidad declara en etiqueta del reactivo LAL para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 28. Cálculo de la media geométrica (GM) para confirmar la sensibilidad declara en etiqueta del reactivo LAL para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

TUBO	ENDOPOINT	LOGARITMO	PROMEDIO	ANTILOGARITMO
1	0,03	-1,5228787		
2	0,03	-1,5228787		
3	0,03	-1,5228787	$\frac{X = -6,09}{4}$	Antilogaritmo - 1,5228787
4	0,03	-1,5228787		
		$\Sigma = -6,091515$	$= -1,52$	$= 0,03$

$$GM = \frac{\text{antilog log (sensibilidad)}}{\text{Número de repeticiones}}$$

$$= \frac{\text{antilog}(\log 0,03 + \log 0,03 + \log 0,03 + \log 0,03)}{4}$$

$$= \frac{\text{antilog}(-6,091515)}{4} = 0,03 \text{ UE/mL}$$

Conclusión: Se cumple que 2λ es mayor que $\lambda = 0,03 \text{ UE/mL}$ y menor que $0,5 \lambda$. Se confirma la sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo LAL.

PRUEBA DE FACTORES DE INTERFERENCIA PARA EL MÉTODO GEL-CLOT. PRUEBA DE INHIBICIÓN Y DE POTENCIACIÓN.

La Tabla 29 indica el primer ensayo de inhibición y potenciación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 29. Primer ensayo de inhibición y potenciación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBOS	Aa	Bb				Cc				Dd	
	SOLUCIÓN DE LA MUESTRA	CSE EN SOLUCIÓN DE LA MUESTRA(EU/mL)				CSE EN AGUA LAL (EU/mL)				AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTERIL
		2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	Control (-)	Control (-)
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)						
4	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)						

La Tabla 30 indica el segundo ensayo de inhibición y potenciación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 30. Segundo ensayo de inhibición y potenciación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBOS	Aa	Bb				Cc				Dd	
	SOLUCIÓN DE LA MUESTRA	CSE EN SOLUCIÓN DE LA MUESTRA(EU/mL)				CSE EN AGUA LAL (EU/mL)				AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTERIL
		2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	Control (-)	Control (-)
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)						
4	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)						

La Tabla 31 indica el tercer ensayo de inhibición y potenciación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 31. Tercer ensayo de inhibición y potenciación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBOS	Aa		Bb				Cc				Dd	
	SOLU- CIÓN DE LA MUES- TRA	CSE EN SOLUCIÓN DE LA MUESTRA(EU/ mL)				CSE EN AGUA LAL (EU/mL)				AGUA LAL	AGUA DE INYECC- IÓN ES- TERIL	
		2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	2λ	1λ	0,5λ	0,25λ			Control (-)
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	
3	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)							
4	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)							

Conclusión: Se cumple que la solución A de la muestra y el control negativo D no muestra reacción (no se forma gel). En la solución B de la muestra se cumple que la reacción no es menor de 0,5λ y no mayor de 2λ. En la solución C de la muestra se cumple que la reacción no es menor de 0,5λ y no mayor de 2λ. Finalmente se

concluye que la solución de la muestra no contiene factores que interfieren en las condiciones del ensayo.

PRUEBA DE LÍMITE DE COAGULACIÓN:

La Tabla 32 indica el primer ensayo de límite de coagulación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 32. Primer ensayo de límite de coagulación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBO	CSE EN SOLUCIÓN DE LA MUESTRA(EU/mL)		CSE EN AGUA LAL Y AGUA DE INYECCIÓN ESTÉRIL (EU/mL)			
	A	B	C	D	D	
	SOLUCIÓN DE LA MUESTRA	2λ	2λ	AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTERIL	
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
3	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
4	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	

La Tabla 33 indica el segundo ensayo de límite de coagulación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 33. Segundo ensayo de límite de coagulación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBO	CSE EN SOLUCIÓN DE LA MUESTRA(EU/mL)		CSE EN AGUA LAL Y AGUA DE INYECCIÓN ESTÉRIL (EU/mL)		
	A	B	C	D	D
	SOLUCIÓN DE LA MUESTRA	2λ	2λ	AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTERIL
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
3	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
4	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)

La Tabla 34 indica el tercer ensayo de límite de coagulación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 34. Tercer ensayo de límite de coagulación para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBO	CSE EN SOLUCIÓN DE LA MUESTRA(EU/mL)		CSE EN AGUA LAL Y AGUA DE INYECCIÓN ESTÉRIL (EU/mL)		
	A	B	C	D	D
	SOLUCIÓN DE LA MUESTRA	2λ	2λ	AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTERIL
1	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
2	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
3	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
4	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)

Conclusión: Se cumple que las dos repeticiones de las soluciones B y C muestran reacción (formación de gel). En ambas repeticiones en la solución D de control negativo del Agua LAL, no muestra reacción (no se forma gel). En la solución A, ambas repeticiones de la solución de la muestra no muestra reacción (no se forma gel). La muestra cumple con la prueba a una dilución que no exceda el MVD. Finalmente

según los resultados obtenidos se confirma el límite de coagulación.

ENSAYO GEL-CLOT:

Especificación: Las diluciones repetidas de la solución 4 de control negativo son negativas; las diluciones repetidas de solución 2 de control positivo del producto son positivas.

Resultados: CONFORME. La

solución 4 de control negativo deben ser negativas ambas repeticiones. La solución 2 de control positivo, deben ser positivas ambas repeticiones.

La Tabla 35 indica el primer ensayo de gel-clot para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 35. Primer ensayo de gel-clot para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBO	SOLUCIÓN 1				SOLUCIÓN 2 SOLUCIÓN DE LA MUESTRA	SOLUCIÓN 3 CONCENTRACIÓN ESTANDAR DE ENDOTOXINA EN AGUA LAL				SOLUCIÓN 4	
	FACTOR DE DILUCIÓN DE LA MUESTRA					2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTÉRIL
	8	4	2	1							
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

La Tabla 36 indica el segundo ensayo de gel-clot para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 36. Segundo ensayo de gel-clot para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBO	SOLUCIÓN 1				SOLUCIÓN 2 SOLUCIÓN DE LA MUESTRA	SOLUCIÓN 3 CONCENTRACIÓN ESTANDAR DE ENDOTOXINA EN AGUA LAL				SOLUCIÓN 4	
	FACTOR DE DILUCIÓN DE LA MUESTRA					2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTÉRIL
	8	4	2	1							
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

La Tabla 37 indica el tercer ensayo de gel-clot para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 37. Tercer ensayo de gel-clot para la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

ENSAYO TUBO	SOLUCIÓN 1				SOLUCIÓN 2 SOLUCIÓN DE LA MUESTRA	SOLUCIÓN 3 CONCENTRACIÓN ESTANDAR DE ENDOTOXINA EN AGUA LAL				SOLUCIÓN 4	
	FACTOR DE DILUCIÓN DE LA MUESTRA					2λ	1λ	0,5λ	0,25λ	AGUA LAL	AGUA DE INYECCIÓN ESTÉRIL
	8	4	2	1							
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

Conclusión: Se cumple que las dos repeticiones de las soluciones B y C muestran reacción (formación de gel).

En ambas repeticiones en la solución D de control negativo del Agua LAL, no muestra reacción (no se forma gel). En

la solución A, ambas repeticiones de la solución de la muestra no muestra reacción (no se forma gel). La muestra cumple con la prueba a una dilución que no exceda el M.V.D. Finalmente según los resultados obtenidos se confirma el límite de coagulación

CONTROL MICROBIOLÓGICO EN EL ÁREA DE RECuento MICROBIANO-LAL:

Tabla 38. Primer control microbiológico ambiental de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas. BET = Prueba de endotoxinas bacterianas.

ZONA	UBICACIÓN	BACTERIAS (UFC/P/H)	HONGOS (UFC/P/H)	ENSAYO REALIZADO
Área LAL	Próximo al sistema de inyección de aire	< 1	< 1	Validación de BET
	Próximo al sistema de extracción de aire	< 1	< 1	
	Próximo a la mesa de trabajo	< 1	< 1	
	Esclusa de persona Ingreso al área LAL	3	< 1	

Resultado: Conforme según la especificación.

Segundo ensayo: La Tabla 39 indica el segundo control microbiológico ambiental de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 39. Segundo control microbiológico ambiental de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas. BET = Prueba de endotoxinas bacterianas.

ZONA	UBICACIÓN	BACTERIAS (UFC/P/H)	HONGOS (UFC/P/H)	ENSAYO REALIZADO
Área LAL	Próximo al sistema de inyección de aire	< 1	< 1	Validación de BET
	Próximo al sistema de extracción de aire	< 1	< 1	
	Próximo a la mesa de trabajo	< 1	< 1	
	Esclusa de persona Ingreso al área LAL	2	< 1	

CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL

Especificación: Grado C: Máximo 50 UFC/Placa.

Método: Exposición por placas.

Primer ensayo: La Tabla 38 indica el primer control microbiológico ambiental de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Resultado: Conforme según la especificación. tercer control microbiológico ambiental de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tercer ensayo: La Tabla 40 indica el bacterianas.

Tabla 40. Tercer control microbiológico ambiental de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas. BET = Prueba de endotoxinas bacterianas.

ZONA	UBICACIÓN	BACTERIAS (UFC/P/H)	HONGOS (UFC/P/H)	ENSAYO REALIZADO
Área LAL	Próximo al sistema de inyección de aire	< 1	< 1	Validación de BET
	Próximo al sistema de extracción de aire	< 1	< 1	
	Próximo a la mesa de trabajo	< 1	< 1	
	Esclusa de persona Ingreso al área LAL	2	< 1	

Resultado: Conforme según la especificación

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE SUPERFICIE DE EQUIPOS E INSTALACIONES:

Especificaciones: Equipos ≤ 5 UFC/ 25cm² y Piso ≤ 10 UFC / 25cm²

Método: Hisopado de superficie.

Primer ensayo: La Tabla 41 indica el primer control microbiológico de superficie de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 41. Primer control microbiológico de superficie de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas. BET = Prueba de endotoxinas bacterianas. UFC = Unidades formadoras de colonias.

ÁREA	UBICACIÓN	BACTERIAS (UFC/25 cm ²)	HONGOS (UFC/25 cm ²)	ENSAYO REALIZADO
	Mesa de trabajo	2	<1	
Recuento Microbiano	Baño de agua	2	<1	Validación de BET
	Vortex	2	<1	
	Piso	<1	<1	

Resultado: Conforme según la especificación

Segundo ensayo: La Tabla 42 indica el segundo control microbiológico de superficie de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 42. Segundo control microbiológico de superficie de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas. BET = Prueba de endotoxinas bacterianas. UFC = Unidades formadoras de colonias.

ÁREA	UBICACIÓN	BACTERIAS (UFC/25 cm ²)	HONGOS (UFC/25 cm ²)	ENSAYO REALIZADO
	Mesa de trabajo	<1	<1	
Recuento Microbiano	Baño de agua	2	<1	Validación de BET
	Vortex	2	<1	
	Piso	2	<1	

Resultado: Conforme según la especificación.

Tercer ensayo: La Tabla 43 indica el tercer control microbiológico de superficie de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas.

Tabla 43. Tercer control microbiológico de superficie de los ensayos correspondientes a la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas. BET = Prueba de endotoxinas bacterianas. UFC = Unidades formadoras de colonias.

ÁREA	UBICACIÓN	BACTERIAS (UFC/25 cm ²)	HONGOS (UFC/25 cm ²)	ENSAYO REALIZADO
	Mesa de trabajo	1	<1	
Recuento Microbiano	Baño de agua	1	<1	Validación de BET
	Vortex	1	<1	
	Piso	3	<1	

Resultado: Conforme según la especificación

DISCUSIÓN

Con respecto a la calificación de los equipos, los resultados obtenidos en la calificación del horno esterilizador, los ensayos demuestran que la temperatura no se distribuye de manera uniforme en toda la cámara del horno, lo cual requiere mayor tiempo de calentamiento para alcanzar la temperatura establecida, considerados como los puntos fríos. Tal comportamiento se debe a que la resistencia del horno se encuentra en la parte inferior, además el sistema de recirculación de aire provoca un retardo en la homogenización de la temperatura en la cámara por el mecanismo de transferencia de calor por convección. Este comportamiento y fluctuaciones de temperatura entre los ensayos en el horno esterilizador es similar a los resultados hallados por Perdomo & Montero (2003).

Con relación a la validación del pro-

ceso despirogenización, según Dawson (1993), y Perdomo & Montero (2003), en los ensayos los aspectos más discutidos han sido la recuperación de la endotoxina, posiblemente por las características del recipiente, el método para la extracción y el uso de indicadores comerciales sin exactitud en la potencia de la endotoxina (WHO, 2011). En los ensayos realizados en el presente trabajo, se usó un Indicador de endotoxina el cual se adquirió en Gen Lab® y tiene la garantía de Charles River cuya potencia se especifica en su certificado de análisis.

De acuerdo a la Validación de BET (prueba de endotoxinas bacterianas) (Wheeler, 2017), se confirma la sensibilidad del etiquetado del reactivo LAL en las diferentes concentraciones de endotoxina: 2λ, λ, 0,5λ, 0,25λ, en donde la sensibilidad declarada del reactivo es 0,03 UE·mL⁻¹. En la recuperación

se obtuvo 10 000 UE en el indicador no expuesto, demostrando la potencia de la endotoxina contenida en cada indicador. Los ensayos confirman que el ciclo de despirogenización reduce más de 3 logaritmos y por ende cumple con la especificación mencionada en la literatura. Se verificó mediante los resultados estadísticos donde la media geométrica obtenida de los logaritmos de la última concentración es donde se presentó la formación del gel, estuvo dentro del rango permitido entre 0,5 λ y 2 λ , a partir de ello se confirma la sensibilidad declarada en la etiqueta. Según los datos estadísticos los dos ensayos cumplen con los parámetros establecidos en la USP (Solís, 2004) y USP (2012abc).

Solís (2004) en sus resultados establece la evidencia que el producto evaluado no inhibe ni magnifica la reacción de endotoxinas. Se verificó en los ensayos, que la detección de endotoxinas no se ve afectado por el dispositivo médico Catéter Venoso Central de 30 cm, para lo cual se realizó las pruebas de la sensibilidad del reactivo en el producto, en agua LAL y agua de inyección estéril, para confirmar y comparar que la detección de endotoxinas no fue afectada por el producto (Osorio *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2011).

La información obtenida a través de la prueba de Límite de coagulación muestra que el dispositivo médico Extraflux 30cm, no contiene una concentración de endotoxinas mayor al límite de endotoxi-

nas especificado según USP 20 UE/dispositivo, el cual se basa en la formación de gel en la presencia de endotoxinas en una concentración mayor a la sensibilidad del reactivo LAL. El resultado cumple con el parámetro establecido por la ICH (2010) y USP (2012abc).

De acuerdo a los resultados de los ensayos gel-clot, se determinó que las concentraciones de la muestra del dispositivo médico Catéter Venoso Central de 30 cm no presenta formación de gel, además las concentraciones de agua LAL y la Concentración Estándar de Endotoxina, forman gel en las concentraciones λ y 2 λ . Se confirma el cumplimiento de lo establecido por la ICH (2010), USP (2012) y Sharma *et al.*, (2011).

Se realizó la validación de la técnica analítica para la prueba BET-método gel-clot en el catéter venoso central de 30 cm. Se calificaron los equipos: horno esterilizador HE-004 y baño de agua BM-001 que intervienen en la prueba de BET-método gel-clot en el catéter venoso central de 30 cm. Se validó el proceso de despirogenización del horno esterilizador en los materiales que se emplean para la BET- método gel-clot en el catéter venoso central de 30 cm. Se realizó la validación del método gel-clot en el catéter venoso central de 30 cm. Se estableció mediante los resultados obtenidos que la BET - método gel-clot en el catéter venoso central de 30 cm cumple con los parámetros establecidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbar, B.J.; Jalal, K. C.; Kamaruzzaman, Y.B. & Zaleha, K. 2010. Mechanism in the clot formation of horseshoe crab blood during bacterial endotoxin invasion. *Journal of Applied Sciences*, 10: 1930-1936.
- Aldaña, M.C. 1997. *Estudio preliminar de la interferencia de Compuestos Proteicos de Radiofármacos en la prueba lisado de amebocitos de Limulus (LAL)*. Informe de Tesis. Guatemala. pp. 14-15.
- Burguet, N.L. & Brito, G.C. 2012. Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. *Vaccimonitor*, 21: 32-36.
- Burguet, N.L.; Reyes, T.M.; Brito, G.C. & Troche, C.Y. 2012. Valoración de endotoxinas bacterianas en el inyectable ácido zoledrónico mediante la prueba de lisado del amebocito de *Limulus*. *Revista Cubana de Farmacia*, 46: 320-328.
- Caro, C. N. & Cruz, M. Y. 2006. *Validación de las pruebas de esterilidad por la técnica de filtración por membrana y endotoxinas bacterianas por el método de LAL en 3 productos farmacéuticos*. Trabajo de grado de Microbiología Industrial. Bogotá. pp. 18-22.
- Carrillo, C.; Ospina, J.; Aldana, D.; Arias, J. & Echeverri, C. 2006. Valoración de endotoxinas bacterianas en Ranitidina y Penicilina G sódica inyectable mediante la prueba de lisado del Amebocito de *Limulus*. *Universitas Scientiarum*, 11: 15-28.
- Cervantes, M. L.; Cruz L; Burgos, J.D.; Robles, L.F. & Sandoval, L.M. 2009. *Protocolo para la calificación de área y equipo de encapsulado como material educativo para la enseñanza de la validación de procesos en la FES Zaragoza*. Universidad Autónoma de México. Edusfarm. México D.F. pp. 4-8.
- Dawson, E.M. 1993. *Depyrogenation*. Associates of Cape Cod. Inc. Lal Update Vol. 11. Number 5. Massachusetts pp. 2-4.
- Dobrovolskaia, M.A.; Neun, B.W.; Clogston, J.D.; Grossman, J.H. & McNeil, S.E. 2014. Choice of method for detection depends on nanoformulation. *Nanomedicine*, 9: 1847-1856.
- EI (Endotoxin indicators). 2016. Charles River Endosafe. Catalog #Evv10K.
- EP (European Pharmacopoeia). 2012. *Pyrogens*. London. Cap.2.6.8. pp.152.
- Fariña, H.C. 2006. *Calificación de equipos que participan en el proceso de encapsulación y en el sistema de calefacción, ventilación y aire acondicionado*. Unidad de Práctica Profesional para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago de Chile. pp. 8-10.
- FA (Farmacopea argentina). 2012. *Ensayo de Endotoxinas Bacterianas*. Cap. 330.
- García, G. V. 2009. *Auditorías para fabricantes de dispositivos médicos*. Trabajo para obtener el título de Químico Farmacéutico Bióloga. México D.F. pp.6.

- Groven, M.J. 1990. *Sterile Pharmaceutical Manufacturing Applications for the 1900's*. Vol. II. Philadelphia. pp. 270-272.
- IAEA (International Atomic Energy Agency-Preparation of Kits for Tc Radiopharmaceuticals). IAEA. 1992. Doc. Tec. N° 649, Austria.
- ICH (The International Conference on Harmonisation). 2010. *Evaluation and recommendation of Pharmacopoeial text for use in the ICH Regions on Bacterial Endotoxins Test*. General Chapter Q4B Anex 14. Estados Unidos. pp.1-9.
- Joiner, T.J.; Kraus, P.F. & Kupier, T.C. 2002. Comparison of endotoxin testing methods for pharmaceutical products. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 6: 408-409.
- Mitra, A.; Joshi, S.; Arjun, C.; Kulkarni, S. & Rajan, R. 2014. *Limulus* amoebocyte lysate testing: Adapting it for determination of bacterial endotoxin in ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceuticals at a hospital radiopharmacy. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 42: 278-282.
- Neugodova, N.P.; Dolgova, G.V.; Ukolov, V.A.; & Sapozhnikova, G.A. 2003. Determination of bacterial endotoxins in urografin injection preparations using a cel-thrombus modification of the LAL test. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37: 563-565.
- Novitsky T. 1991. *Discovery and commercial development*. Associates of Cape Cod. Inc. Lal Update Vol. 14. Number 2. Massachusetts. pp. 1-4.
- Novitsky T. 1994. *Potency, certificates of analysis and international standards LAL*. Update, 2.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1998. *Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación*. Segunda parte: Validación. Ginebra. pp.7-12.
- Osorio, R. O.; Pérez, M. X.; Arias, P. J.; Rodríguez, V. D. & Fernández, L. C. 2007. Interferencias en la validación del ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* para oxitetraciclina 50 mg/mL. *Revista Cubana de Farmacia*, 41: 1-4.
- Ouédraogo, M.; Semdé R.; T Somé, I.; Ouédraogo, M.; Ouédraogo, R.; Evrard, B.; Dubois, J.; Amighi, K. & Guissou, I. 2009. Development of an *in vitro* endotoxin test for monoolein-water liquid crystalline Gel for use as an Implant. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8: 501-508.
- Perdomo, M.R. & Montero, A.V. 2003. Validación de un ciclo de despirogenización por calor seco con el empleo del ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus*. *Revista Cubana de Farmacia*, 41:1-8.
- Pérez, G.E. 1996. *Evaluación de endotoxinas bacterianas (pirógenos) de los parenterales masivos de mayor consumo en los hospitales nacionales del área Metropolitana*. Informe de Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Guatemala. pp.2-7.

- Sandle, T. 2012. Pyrogens. Endotoxin and the LAL test: An Introduction in relation to pharmaceutical Processing. Global BioPharmaceutical Resources, Inc.
- Sharma, S.; Mittal, B.R.; Vatsa, R. & Singh, B. 2011. Gel clot bacterial endotoxin test of FDG: Indian scenario. *Indian Journal of Nuclear Medicine*, 26: 149-152.
- Solis, A.J. 2004. *Validación de la prueba de endotoxinas bacterianas LAL (Limulus ameobocyte lysate) por el método de Gel Clot en Clindamicina 600 mg. inyectable*. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico. pp.19-40.
- USP (United States Pharmacopeia). 2012a. *Prueba de Endotoxina Bacterianas*. Rockville. Cap. 81. pp.84-87.
- USP (United States Pharmacopeia). 2012b. *Pruebas de Reactividad Biológica, in vivo*. Rockville. Cap. 88. pp.91.
- USP (United States Pharmacopeia). 2012c. *Calificación de Instrumentos Analíticos*. Rockville. Cap. 1058. pp.605-606.
- Wheeler, A. 2017. Comparing endotoxin detection methods. *Pharmaceutical Technology*, 41: 58-62.
- WHO (World Health Organization). 2011. *Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparations*. No. 961, Forty – fifth. Ginebra. pp.71-73.
- Zimmer, A.M. & Spies, S.M. 1979. *Quality Control of Radiotracers, Section of Nuclear Medicine*. Department of Radiology. Northwestern University Medical Center. Chicago, Illinois. pp. 270-291.

Received October 8, 2018.

Accepted December 28, 2018.