

Actualización

330. ENSAYOS DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS ICH

1 La Prueba de Endotoxinas Bacterianas (PEB) es
2 una prueba para detectar o cuantificar endotoxinas
3 de bacterias gramnegativas usando un lisado de
4 amebocitos del cangrejo herradura (*Limulus*
5 *polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*).

6 Hay tres técnicas para esta prueba: la técnica de
7 coagulación (gel-clot), la cual está basada en la
8 formación de gel; la técnica turbidimétrica, basada
9 en la producción de turbidez después de la ruptura
10 de uniones de un sustrato endógeno; y la técnica
11 cromogénica que se basa en el desarrollo de color
12 después de la ruptura de un complejo sintético
13 péptido-cromógeno. Efectuar la prueba con
14 cualquiera de las tres técnicas. En caso de duda o
15 controversia, la decisión final se toma basándose en
16 la prueba de límite de coagulación, a menos que se
17 indique algo diferente en la monografía del
18 producto en análisis. La prueba se efectúa de forma
19 tal que se evite la contaminación por endotoxinas.

APARATOS

22 Eliminar los pirógenos de todo el material
23 de vidrio y otros materiales termoestables en un
24 horno de aire caliente, mediante un proceso
25 validado. Habitualmente se usan 30 minutos a
26 250 °C como tiempo y temperatura mínimos. Si
27 se emplean materiales de plástico, tales como
28 microplacas y puntas de pipetas para
29 pipeteadores automáticos, usar los que han
30 demostrado estar exentos de endotoxinas
31 detectables y no interferir con la prueba.
32 [NOTA—En este capítulo, el término “tubo”
33 incluye cualquier otro receptáculo, como por
34 ejemplo los pocillos de las placas de
35 microtitulación.]

REACTIVOS Y SOLUCIONES DE PRUEBA

36 **Lisado de Amebocitos** - Producto
37
38 liofilizado obtenido a partir de un lisado de
39 amebocitos (leucocitos) del cangrejo herradura
40 (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus*
41 *tridentatus*). Este reactivo se refiere solo a un
42 producto fabricado de conformidad con las
43

reglamentaciones de la autoridad competente.

[NOTA—El Lisado de Amebocitos reacciona con algunos β -glucanos además de reaccionar con las endotoxinas. Existen preparaciones de Lisado de Amebocitos que no reaccionan con los glucanos: se preparan retirando del Lisado de Amebocitos el factor G que reacciona con los glucanos o inhibiendo el sistema de reacción del factor G del Lisado de Amebocitos. Se pueden usar para pruebas de endotoxinas en presencia de glucanos.]

Agua para Prueba de Endotoxinas

Bacterianas (PEB) - Emplear *Agua para Inyectables* o agua producida por otros procedimientos y que no reaccione con el lisado empleado, en el límite de detección del reactivo.

Solución de Lisado - Disolver con agitación suave el Lisado de Amebocitos en *Agua para PEB* o en una solución reguladora recomendada por el fabricante del lisado. Almacenar el lisado reconstituido, refrigerado o congelado, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Solución Madre del Estándar de Endotoxina

- Preparar a partir de un Estándar de Endotoxina ▲reconocido por la autoridad competente▲ que haya sido calibrado con el Estándar Internacional

para Endotoxinas vigente de la OMS. Seguir las especificaciones en el prospecto del empaque y en la etiqueta para la preparación y almacenamiento de la Solución Madre del Estándar de Endotoxina. El contenido de endotoxina se expresa en Unidades de Endotoxina (UE). [NOTA—Una Unidad de Endotoxina (UE) es igual a una Unidad Internacional (UI) de endotoxina.]

Soluciones Estándar de Endotoxina -

Después de mezclar vigorosamente la *Solución Madre del Estándar de Endotoxina*, preparar las diluciones seriales apropiadas de la Solución Estándar de Endotoxina, usando *Agua para PEB*. Emplear las diluciones tan pronto como sea posible para evitar la pérdida de actividad por adsorción.

Soluciones Muestra - Preparar las

Soluciones Muestra disolviendo o diluyendo los medicamentos, usando *Agua para PEB*. Algunas sustancias o preparaciones se pueden disolver o diluir adecuadamente en otras soluciones acuosas. Si fuera necesario, ajustar el pH de la solución (o de la dilución) a examinar de modo que el pH de la mezcla del lisado y la Solución Muestra se encuentre dentro del intervalo de pH especificado por el

97 fabricante del lisado, por lo general entre 6,0–8,0.
 98 El pH se puede ajustar con un ácido, una base o una
 99 solución reguladora adecuada según lo recomiende
 100 el fabricante del lisado. Los ácidos y las bases se
 101 pueden preparar a partir de concentrados o sólidos
 102 con *Agua para PEB* en recipientes exentos de
 103 endotoxinas detectables. Las soluciones reguladoras
 104 se deben validar para garantizar que están exentas
 105 de endotoxinas y otros factores de interferencia
 106 detectables.

107 **DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA**

108 **DILUCIÓN VÁLIDA (MDV)**

109 La máxima dilución válida es la dilución
 110 máxima permisible de una muestra a la que se le
 111 puede determinar el límite de endotoxina.

112 Determinar la MDV a partir de la fórmula siguiente

113 :

$$114 \text{ MDV} = (\text{límite de endotoxina} \times \text{concentración} \\ 115 \text{ de la Solución Muestra}) / (\lambda)$$

116 El *Límite de endotoxinas* para medicamentos de
 117 administración parenteral, definido según la dosis,
 118 es igual a:

$$119 \quad K/M$$

120 donde K es la dosis pirogénica umbral de
 121 endotoxina por kg de peso corporal y M es
 122 igual a la dosis máxima recomendada del
 123 producto, en bolo, por kg de peso corporal.
 124 Cuando el producto se va a inyectar a intervalos
 125 frecuentes o por infusión continua, M es la
 126 dosis máxima total administrada durante un
 127 periodo de una hora. El *Límite de endotoxinas*
 128 para los medicamentos de administración
 129 parenteral se especifica en la monografía
 130 individual en unidades como UE por mL, UE
 131 por mg, UE por Unidad de actividad biológica,
 132 etc.

133 La *concentración de la Solución Muestra*
 134 deberá expresarse de la siguiente manera:

- 135 - mg por mL: en el caso del límite de
 136 endotoxina especificado por peso (UE
 137 por mg);
- 138 - Unidades por mL: en el caso del límite
 139 de endotoxina especificado por unidad
 140 de actividad biológica (UE por
 141 Unidad);
- 142 - mL por mL: cuando el límite de
 143 endotoxina se especifica por volumen
 144 (UE por mL).

145 λ es la sensibilidad declarada en la *Técnica*
 146 *de Coagulación* (UE por mL) o la

147 concentración más baja usada en la curva estándar
148 para la *Técnica Turbidimétrica* o la *Técnica*
149 *Cromogénica*.

150 **TÉCNICA DE COAGULACIÓN**

151 La técnica de coagulación se usa para detectar o
152 cuantificar endotoxinas basándose en la
153 coagulación del lisado empleado como reactivo en
154 presencia de endotoxina. La concentración mínima
155 de endotoxina requerida para hacer que el lisado se
156 coagule en las condiciones estándar es la
157 sensibilidad declarada del lisado empleado como
158 reactivo. Para garantizar tanto la precisión como la
159 validez del ensayo, efectuar las pruebas para
160 confirmar la sensibilidad declarada del lisado y para
161 determinar factores de interferencia según se
162 describe en *Pruebas Preparatorias*.

163 **Pruebas Preparatorias**

164 **Prueba de confirmación de la sensibilidad** 165 **declarada del lisado**

166 Confirmar en cuatro determinaciones repetidas
167 la sensibilidad declarada, λ , expresada en UE por
168 mL del lisado antes de usarlo en el ensayo. La
169 prueba de confirmación de sensibilidad del lisado se
170 debe llevar a cabo cuando se usa una partida nueva
171 de lisado o cuando hay algún cambio en las
172

173 condiciones de la prueba que pueda afectar el
174 resultado. Preparar soluciones estándar con al
175 menos cuatro concentraciones equivalentes a
176 2λ , λ , $0,5\lambda$ y $0,25\lambda$, diluyendo el Estándar de
177 Endotoxina en *Agua para PEB*.

178 Mezclar un volumen de la *Solución de*
179 *Lisado* con un volumen igual (como por
180 ejemplo alícuotas de 0,1 mL) de una de las
181 *Soluciones Estándar de Endotoxina* en cada
182 tubo de ensayo. Cuando se usen viales o
183 ampollas de prueba individuales que contengan
184 lisado liofilizado, agregar directamente las
185 soluciones al vial o a la ampolla. Incubar la
186 mezcla de reacción durante un período
187 constante según las instrucciones del fabricante
188 del lisado (habitualmente a 37 ± 1 °C durante
189 60 ± 2 minutos), evitando vibraciones. Para
190 analizar la integridad del gel, sacar uno a uno
191 los tubos directamente de la incubadora y con
192 un único movimiento suave, invertirlos
193 aproximadamente a 180°. Si se ha formado un
194 gel firme que permanece en su lugar después de
195 invertir los tubos, registrar el resultado como
196 positivo. Un resultado es negativo si no se
197 forma un gel intacto. La prueba se considera
198 válida cuando la concentración más baja de las

199 soluciones estándar presenta un resultado negativo
200 en todas las pruebas repetidas.

201 El punto final es la concentración más baja en la
202 serie de concentraciones decrecientes de endotoxina
203 estándar que coagula el lisado. Determinar la media
204 geométrica del punto final calculando la media de
205 los logaritmos de las concentraciones en el punto
206 final de la serie de cuatro determinaciones repetidas
207 y calculando luego el antilogaritmo de la media,
208 según se indica en la siguiente fórmula:

209 media geométrica de la concentración en el punto

$$210 \text{ final} = \text{antilogaritmo } (\Sigma e/f)$$

211 donde Σe es la suma de los logaritmos de las
212 concentraciones en el punto final de la serie de
213 diluciones utilizadas, y f es el número de tubos de
214 ensayo repetidos. La media geométrica de la
215 concentración en el punto final es la sensibilidad
216 medida del lisado (en UE por mL). Si no es menor
217 de $0,5\lambda$ y no es mayor de 2λ , se confirma la

218 sensibilidad declarada y se usa en las pruebas
219 realizadas con este lisado.

220 **Prueba de factores de interferencia**

221 Por lo general, preparar soluciones (A–D)
222 según se indica en la *Tabla 1*, y efectuar la
223 prueba de inhibición o potenciación en las
224 *Soluciones Muestra* con una dilución menor
225 que la máxima dilución válida (MDV), que no
226 contenga endotoxinas detectables, procediendo
227 según se describe en *Prueba de Confirmación*
228 *de la Sensibilidad Declarada del Lisado*. La
229 media geométrica de las concentraciones en el
230 punto final de las *Soluciones B* y *C* se
231 determina usando la fórmula descrita en la
232 *Prueba de Confirmación de la Sensibilidad*
233 *Declarada del Lisado*. La prueba de factores de
234 interferencia deberá repetirse siempre que se
235 presenten cambios en alguna de las condiciones
236 que pudieran influir en el resultado de la
237 prueba.

238 **Tabla 1. Preparación de Soluciones para la Prueba de Inhibición/Potenciación para Técnicas de**
239 **Coagulación**

240

Solución	Concentración de Endotoxina/ Solución a la que se agrega Endotoxina	Diluyente	Factor de dilución	Concentración de Endotoxina	Número de réplicas
A	Ninguna/Solución Muestra	-	-	-	4
B	2λ/Solución Muestra	Solución muestra	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0,5λ	4
			8	0,25λ	4
C	2λ/Agua para PEB	Agua para PEB	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0,5λ	2
			8	0,25λ	2
D	Ninguna/Agua para PEB	-	-	-	2

Solución A: Solución Muestra de la preparación en análisis que esté exenta de endotoxinas detectables.

Solución B: Prueba de interferencia.

Solución C: Control para sensibilidad declarada del lisado.

Solución D: Control negativo de Agua para PEB

Esta prueba se considera válida cuando todas las determinaciones repetidas de las Soluciones A y D no muestran ninguna reacción y el resultado de la Solución C confirma la sensibilidad declarada.

250 Si la sensibilidad del lisado determinada en
 251 presencia de la *Solución B* no es menor de 0,5λ y no
 252 es mayor de 2λ, la *Solución Muestra* no contiene
 253 factores que interfieran en las condiciones
 254 experimentales usadas. En caso contrario, la
 255 *Solución Muestra* a examinar interfiere con la
 256 prueba.

257 Si la muestra en análisis no cumple con la
 258 prueba a una dilución menor que la MDV, se debe
 259 repetir la prueba empleando una dilución mayor que
 260 no exceda la MDV. El uso de un lisado de mayor
 261 sensibilidad permite una dilución mayor de la
 262 muestra a examinar y esto puede contribuir a la
 263 eliminación de la interferencia.

264 La interferencia se puede resolver mediante un
 265 tratamiento adecuado, como filtración,
 266 neutralización, diálisis o calentamiento. Para
 267 establecer que el tratamiento elegido elimina

268 eficazmente la interferencia sin pérdida de
 269 endotoxinas, realizar la valoración descrita
 270 anteriormente, utilizando la preparación a
 271 examinar, a la que se ha agregado Estándar de
 272 Endotoxina y se ha sometido al tratamiento
 273 seleccionado.

274 **Prueba de Límite**

275 **Procedimiento**

276 Preparar las *Soluciones A, B, C y D* según se
 277 indica en la *Tabla 2* y llevar a cabo la prueba en
 278 estas soluciones siguiendo el procedimiento
 279 indicado anteriormente en la *Prueba de*
 280 *Confirmación de la Sensibilidad Declarada del*
 281 *Lisado en Pruebas Preparatorias.*

282 **Tabla 2. Preparación de Soluciones para la Prueba de Límite de Coagulación**

283

Solución*	Concentración de Endotoxina/ Solución a la que se Agrega Endotoxina	Número de repeticiones
A	Ninguna/ <i>Solución Muestra diluida</i>	2
B	2λ/ <i>Solución Muestra diluida</i>	2

C	2N/Agua para PEB	2
D	Ninguna/Agua para PEB	2

* Preparar la *Solución A* y la *Solución B* de control positivo del producto utilizando una dilución no mayor que la MDV y tratamientos según se indica en la *Prueba de Factores de Interferencia en Pruebas Preparatorias*. Las *Soluciones B* y *C* de control positivo contienen la *Solución Estándar de Endotoxina* a una concentración que corresponde al doble de la sensibilidad declarada del lisado. La *Solución D* de control negativo consiste en *Agua para PEB*.

Interpretación

La prueba se considera válida cuando ambas determinaciones repetidas de las *Soluciones B* y *C* son positivas y las de la *Solución D* son negativas. Cuando se obtiene un resultado negativo para ambas determinaciones repetidas de la *Solución A*, la preparación en análisis cumple con la prueba. Cuando se obtiene un resultado positivo para ambas determinaciones repetidas de la *Solución A*, la preparación en análisis no cumple con la prueba.

Cuando se obtiene un resultado positivo para una de las determinaciones de la *Solución A* y un resultado negativo para la otra, repetir la prueba. En la repetición, la preparación en análisis cumple con la prueba si se obtiene un resultado negativo en ambas determinaciones repetidas de la *Solución A*. La preparación no cumple con la prueba si se

obtiene un resultado positivo para una o ambas determinaciones repetidas de la *Solución A*. Sin embargo, si la preparación no cumple con la prueba a una dilución menor que la MDV, se puede repetir la prueba empleando una dilución mayor que no exceda la MDV.

Prueba Cuantitativa

Procedimiento

La prueba cuantifica endotoxinas bacterianas en las *Soluciones Muestra* por valoración volumétrica hasta un punto final.

Preparar *Soluciones A, B, C* y *D* según se indica en la *Tabla 3* y analizar siguiendo el procedimiento en la *Prueba de Confirmación de la Sensibilidad Declarada del Lisado en Pruebas Preparatorias*.

325

326

327

Tabla 3. Preparación de Soluciones para la Prueba de Coagulación

Solución	Concentración de Endotoxina/ Solución a la que se Agrega Endotoxina	Diluyente	Factor de dilución	Concentración de Endotoxina	Número de réplicas
A	Ninguna/Solución Muestra	Agua para PEB	1	-	2
			2	-	2
			4	-	2
			8	-	2
B	2λ/Solución Muestra	-	1	2λ	2
C	2λ/Agua para PEB	Agua para PEB	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0,5λ	2
			8	0,25λ	2
D	Ninguna/Agua para PEB	-	-	-	2

328

329

330

331

332

Solución A: Solución Muestra en análisis a la dilución, que no debe exceder la MDV, con la cual se completó la Prueba de Factores de Interferencia. Las diluciones subsiguientes de la Solución Muestra no deben exceder la MDV. Usar Agua para PEB para efectuar una serie de diluciones en cuatro tubos que contengan la Solución Muestra en análisis a concentraciones de 1, 1/2, 1/4, y 1/8 con respecto a la concentración usada en la Prueba de Factores de Interferencia. Se pueden usar otras diluciones hasta la MDV, según sea necesario.

Solución B: *Solución A* que contenga endotoxina estándar a una concentración de 2λ (control positivo del producto).

Solución C: Dos series repetidas de cuatro tubos de *Agua para PEB* que contengan la endotoxina estándar a una concentración de 2λ , λ , $0,5\lambda$, y $0,25\lambda$, respectivamente.

Solución D: *Agua para PEB* (control negativo).

Cálculos e interpretación

La prueba se considera válida cuando se cumplen las tres condiciones siguientes:

(1) ambas determinaciones repetidas de la *Solución D* de control negativo son negativas;

(2) ambas determinaciones repetidas de la *Solución B* de control positivo del producto son positivas; y

(3) la media geométrica de la concentración en el punto final de la *Solución C* está comprendida en el intervalo de $0,5\lambda$ a 2λ .

Para determinar la concentración de endotoxinas de la *Solución A*, calcular la concentración en el punto final para cada repetición multiplicando cada factor de dilución del punto final por λ . La concentración de endotoxinas en la *Solución Muestra* es la concentración en el punto final de las repeticiones. Si la prueba se realiza con una *Solución Muestra* diluida, calcular la concentración de endotoxinas en la *Solución Muestra* original multiplicando por el factor de dilución. Si ninguna de las diluciones de la *Solución Muestra* es positiva en un ensayo válido, informar la concentración de

endotoxina como menor que λ (si se analizó la muestra diluida, informar como menor que λ multiplicado por el factor de dilución más bajo de la muestra). Si todas las diluciones son positivas, la concentración de endotoxina se informa como igual o mayor que el factor de dilución mayor por λ (p. ej., el factor de dilución inicial multiplicado por 8 y por λ en la *Tabla 3*).

La preparación cumple con los requisitos del ensayo si la concentración de endotoxinas en ambas determinaciones repetidas es menor que la especificada en la monografía individual.

TÉCNICAS FOTOMÉTRICAS

CUANTITATIVAS

Técnica Turbidimétrica

Esta técnica es una valoración fotométrica que mide los incrementos en turbidez del reactante. Dependiendo del principio empleado en la valoración, esta técnica se puede clasificar como valoración turbidimétrica de punto final o valoración turbidimétrica cinética. La

382 valoración turbidimétrica de punto final se basa en
383 la relación cuantitativa entre la concentración de
384 endotoxinas y la turbidez (absorbancia o
385 transmisión) de la mezcla de reacción al término de
386 un período de incubación. La valoración
387 turbidimétrica cinética es un método para medir el
388 tiempo necesario para alcanzar una absorbancia o
389 transmisión predeterminada de la mezcla de
390 reacción (tiempo de iniciación) o la velocidad de
391 desarrollo de turbidez. La prueba se efectúa a la
392 temperatura de incubación recomendada por el
393 fabricante del lisado (por lo general 37 ± 1 °C).

394 **Técnica Cromogénica**

395 Esta técnica es una valoración para medir el
396 cromóforo liberado de un péptido cromogénico
397 adecuado por la reacción de las endotoxinas con el
398 lisado. Dependiendo del principio empleado en la
399 valoración, esta técnica se puede clasificar como
400 valoración cromogénica de punto final o valoración
401 cromogénica cinética. La valoración cromogénica
402 de punto final se basa en la relación cuantitativa
403 entre la concentración de endotoxinas y la
404 liberación del cromóforo al término de un período
405 de incubación. La valoración cromogénica cinética
406 es un método para medir el tiempo (tiempo de
407 iniciación) necesario para alcanzar una absorbancia

408 predeterminada de la mezcla de reacción o la
409 velocidad de desarrollo de color. La prueba se
410 efectúa a la temperatura de incubación
411 recomendada por el fabricante del lisado (por lo
412 general 37 ± 1 °C).

413 **Pruebas Preparatorias**

414 Con el fin de garantizar la precisión o
415 validez de las técnicas turbidimétricas y
416 cromogénicas, se realizan las pruebas
417 preparatorias para verificar que los criterios
418 para la curva estándar son válidos y que la
419 solución muestra no interfiere con la prueba.
420 Cuando cambian las condiciones que pueden
421 influir en el resultado de la prueba es necesaria
422 la validación del método de prueba.

423 **Garantía de los criterios para la curva** 424 **estándar**

425 La prueba se debe efectuar para cada lote de
426 lisado empleado como reactivo. Utilizando la
427 *Solución Estándar de Endotoxina*, preparar por
428 lo menos tres concentraciones de endotoxina
429 dentro del intervalo indicado por el fabricante
430 del lisado para generar la curva estándar.
431 Realizar la valoración usando por lo menos tres
432 determinaciones repetidas de cada
433 concentración de endotoxina estándar,

siguiendo las instrucciones del fabricante del lisado
 434 (con respecto a relaciones de volumen, tiempo de
 435 incubación, temperatura, pH, etc.). Si el intervalo
 436 deseado en los métodos cinéticos es mayor de dos
 437 logaritmos, se deben incluir estándares adicionales
 438 para que cada aumento logarítmico esté
 439 comprendido en el intervalo de la curva estándar. El
 440 valor absoluto del coeficiente de correlación, r ,
 441 debe ser mayor o igual a 0,980 para el intervalo
 442 establecido de concentraciones de endotoxina.
 443

Prueba para factores de interferencia

445 Seleccionar una concentración de
 446 endotoxina en o cerca del centro de la curva
 447 estándar de endotoxina. Preparar las *Soluciones*
 448 *A, B, C y D* según se indica en la *Tabla 4*.
 449 Llevar a cabo la prueba en las *Soluciones A, B,*
 450 *C y D* al menos por duplicado, de acuerdo con
 451 las instrucciones del lisado empleado, por
 452 ejemplo, en lo que respecta al volumen entre la
 453 *Solución Muestra* y la *Solución de Lisado*, la
 454 relación de volumen de la *Solución Muestra* y
 455 la *Solución de Lisado*, el tiempo de incubación,
 456 etc.

457 **Tabla 4. Preparación de Soluciones para la Prueba de Inhibición/Potenciación para Técnicas**
 458 **Fotométricas**
 459

Solución	Concentración de Endotoxina	Solución a la que se Agrega Endotoxina	Número de repeticiones
A	Ninguna	<i>Solución Muestra</i>	No menos de 2
B	Concentración central de la curva estándar	<i>Solución Muestra</i>	No menos de 2
C	Al menos 3 concentraciones (la concentración más baja se denomina λ)	<i>Agua para PEB</i>	No menos de 2 para cada una
D	Ninguna	<i>Agua para PEB</i>	No menos de 2

Solución A: Solución Muestra se puede diluir sin que exceda la MDV.

461 *Solución B:* La preparación en análisis a la misma dilución que la *Solución A*, que contenga endotoxina agregada a una
 462 concentración igual o cercana a la concentración central de la curva estándar.

463 *Solución C:* La endotoxina estándar a las concentraciones usadas en la validación del método descrito para *Garantía de*
 464 *Criterios para la Curva Estándar en Pruebas Preparatorias* (controles positivos).

465 *Solución D:* Agua para PEB (control negativo).

466 La prueba se considera válida cuando se
 467 cumplen las condiciones siguientes.

468 (1) El valor absoluto del coeficiente de
 469 correlación de la curva estándar generada usando la
 470 *Solución C* es mayor o igual a 0,980.

471 (2) El resultado de la *Solución D* no excede el
 472 límite del valor del blanco requerido en la
 473 descripción del lisado empleado como reactivo o es
 474 menor que el límite de detección de endotoxina del
 475 lisado empleado como reactivo.

476 Calcular la recuperación media de la endotoxina
 477 agregada restando la concentración media de
 478 endotoxina en la solución, si la hubiera (*Solución A*,
 479 *Tabla 4*), de la que contiene la endotoxina agregada
 480 (*Solución B*, *Tabla 4*). Para considerar que no
 481 presenta factores que interfieran con la valoración
 482 en las condiciones de la prueba, la concentración
 483 medida de endotoxina agregada a la *Solución*
 484 *Muestra* debe estar entre 50%–200% de la
 485 concentración conocida de endotoxina agregada
 486 después de restar la endotoxina detectada en la
 487 solución sin endotoxina agregada.

488 Cuando la recuperación de endotoxina se
 489 encuentra fuera de los intervalos especificados,
 490 se considera que la *Solución Muestra* en
 491 análisis contiene factores de interferencia.
 492 Luego, repetir la prueba usando una dilución
 493 mayor que no exceda la MDV. Además, la
 494 interferencia de la *Solución Muestra* o de la
 495 *Solución Muestra* diluida que no exceda la
 496 MDV se puede eliminar mediante un
 497 tratamiento validado apropiado, como
 498 filtración, neutralización, diálisis o
 499 calentamiento. Para establecer que el
 500 tratamiento elegido elimina eficazmente la
 501 interferencia sin pérdida de endotoxinas,
 502 realizar la valoración descrita anteriormente
 503 utilizando la preparación a examinar, a la que
 504 se ha agregado Endotoxina Estándar y se ha
 505 sometido posteriormente al tratamiento
 506 seleccionado.

Procedimiento de Prueba

507

508 Seguir el procedimiento descrito anteriormente
509 para *Prueba de Factores de Interferencia* en
510 *Pruebas Preparatorias*.

511 Cálculo

512 Calcular la concentración de endotoxina de cada
513 una de las determinaciones repetidas de la *Solución*
514 *A* usando la curva estándar generada con la
515 *Solución C* de control positivo. La prueba se
516 considera válida cuando se cumplen las tres
517 condiciones siguientes.

518 (1) Los resultados de la *Solución C* de control
519 cumplen con los requisitos de validación definidos
520 en *Garantía de Criterios para la Curva Estándar*,
521 en *Pruebas Preparatorias*.

522 (2) La recuperación de endotoxina, calculada a
523 partir de la concentración encontrada en la *Solución*
524 *B* después de restar la concentración de endotoxina
525 encontrada en la *Solución A* está dentro del
526 intervalo de 50%–200%.

527 (3) El resultado de la *Solución D* de control
528 negativo no excede el límite del valor del blanco
529 requerido en la descripción del lisado empleado o es
530 menor que el límite de detección de endotoxina del
531 lisado empleado como reactivo.

532 Interpretación

533 En las valoraciones fotométricas, la
534 preparación en análisis cumple con la prueba si
535 la concentración media de endotoxinas de las
536 determinaciones repetidas de la *Solución A*,
537 después de la corrección por dilución y
538 concentración, es menor que el límite de
539 endotoxina para el producto.