



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DETECCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE
ENDOTOXINAS BACTERIANAS
INDUCIDAS POR LA ESTERILIZACIÓN
MEDIANTE AUTOCLAVE BAJO LAS
CONDICIONES RECOMENDADAS POR EL
MINISTERIO DE SALUD- PERÚ

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN MICROBIOLOGÍA

OMAR DENILSON VALENZA TRUJILLO

LIMA – PERÚ

2025

ASESOR

DRA. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

JURADO DE TESIS

PRESIDENTE

DRA. MANUELA RENEE VERASTEGUI PIMENTEL

VOCAL

MG. RUTH LILIANA CRISTOBAL DELGADO

SECRETARIO

DRA. NANCY CHILE ANDRADE

DEDICATORIA

A mis padres, por su
apoyo constante y
sacrificios que hicieron posible este logro.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Dora Maurtua por darme la mano y guiarme en el momento más difícil de los estudios de Maestría. Sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

A la Dra Patricia Sheen por su invaluable orientación y apoyo durante la realización de esta tesis. Su dedicación, paciencia y sabiduría fueron fundamentales para el éxito de este trabajo.

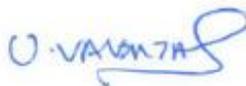
A la empresa Farmacéutica TEVA Perú y la Hospital Dos de Mayo MINSA por facilitar el acceso a recursos, instalaciones y conocimientos especializados que han enriquecido este estudio.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Autofinanciado, SIDISI ID 212248

DECLARACIÓN DE AUTOR

FORMATO PARA LA DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	14	04	20_25
APELLIDOS Y NOMBRES DEL ESTUDIANTE	VALENZA TRUJILLO OMAR DENILSON		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA MICROBIOLOGÍA		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	02	05	20_22
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	"DETECCIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS INYECCIONES POR LA ESTERILIZACIÓN MEDIANTE AUTOCLAVE BAJO LAS CONDICIONES RECOMENDADAS POR EL MINISTERIO DE SALUD -PERU"		
MODALIDAD	PRESENCIAL		
Declaración del Autor			
<p>El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.</p>			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	9 62 31 9827		
E-mail	OMAR.VALENZA@UPCH.PE		



Firma del egresado
DNI 74373860

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 Esterilidad.....	5
3.2 Esterilización con calor húmedo (vapor).....	5
3.2.1 Ciclos básicos de esterilización por vapor.....	7
3.2.2 Factores críticos del autoclavado.....	7
3.3 Enterobacterias productoras de endotoxinas.....	8
3.4 Bio-indicadores.....	8
3.5 Endotoxinas.....	9
3.6 Método de Gel-Clot.....	10
3.7 Condiciones de esterilización – Ministerio de Salud – Perú.....	10
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	12
6. HIPÓTESIS.....	12
7. OBJETIVOS.....	12
7.1 Objetivo general.....	12
7.2 Objetivos específicos.....	13
8. METODOLOGÍA	
8.1 Diseño de estudio.....	14
8.2 Características de autoclave.....	14
8.3 Principio de funcionamiento.....	15
8.4 Operacionalización de variables.....	15
8.5 Tamaño de muestra.....	16
8.6 Distribución de los viales por cada grupo.....	18
8.7 Preparación de inóculos estandarizados.....	18
8.8 Envasado de inóculos de cepas <i>E.coli</i> y <i>S.enterica</i>	19

8.9 Prueba de distribución de calor.....	21
8.10 Carga hospitalaria.....	22
8.11 Esterilización de inóculos.....	24
8.12 Análisis de endotoxinas.....	25
8.13 Análisis estadísticos.....	30
8.14 Consideraciones éticas.....	32
8.15 Bioseguridad.....	32
9. RESULTADOS.....	34
9.1 Determinación de la concentración bacteriana de los inóculos	34
9.2 Prueba de distribución de calor.....	36
9.3 Temperatura y tiempo en cada proceso de esterilización	37
9.4 Análisis de endotoxinas.....	38
9.5 Comparación de los % de positividad entre grupos.....	40
10. DISCUSIÓN.....	42
11. CONCLUSIONES.....	46
12. RECOMENDACIONES.....	47
13. BIBLIOGRAFÍA.....	48

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Operacionalización de las variables.....	16
Tabla 2 Tamaño de muestras y grupos.....	17
Tabla 3 Configuración del proceso de esterilización.....	21
Tabla 4 Ubicación de sensores dentro de carga hospitalaria.....	23
Tabla 5 Distribución de ciclos de esterilización por tipo de inóculo.....	24
Tabla 6 Fechas de esterilización.....	24
Tabla 7 Diluciones de control positivo.....	26
Tabla 8 Fechas de análisis de endotoxinas.....	29
Tabla 9 Reporte de resultados.....	31
Tabla 10 Resultados de distribución de calor (121°C).....	36
Tabla 11 Resultados de distribución de calor (134°C).....	36
Tabla 12 Resultados de tiempo y temperatura de esterilización.....	37
Tabla 13 Porcentaje de positividad de presencia de endotoxinas por grupos	38
Tabla 14 Resultados de detección de endotoxinas.....	39
Tabla 15 Resultados comparativos del promedio de positividad.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Vista frontal de Autoclave Fedegari 03-073.....	15
Figura 2 - Plano de distribución – grupo.....	18
Figura 3- Proceso de envasado de inóculos	20
Figura 4- Viales con inóculos.....	20
Figura 5- Distribución de sensores- cámara vacía de autoclave.....	22
Figura 6 -Distribución de sensores e inóculos dentro de la carga hospitalaria.....	23
Figura 7- Diluciones de certificación de reactivo LAL.....	27
Figura 8- Resultado positivo para la formación de coágulo.....	28
Figura 9- Transmitancia de inóculos <i>E. coli</i>	34
Figura 10 - Transmitancia inóculos <i>S. enterica</i>	35
Figura 11 - Porcentaje de positividad por condición	40

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1

Reporte de validación del método microbiológico para el procedimiento de estandarización de inóculo RV-(MIC-INS-012-02)-00 aprobado el 2017-11-08

Anexo 2

Formato CDC-RGT-011 v7 “Registro de uso de Equipos” Lectura de transmitancia – Inóculos *E. coli*.y *S. enterica* Laboratorio Microbiología -Teva Perú

Anexo 3

Reporte de Esterilización equipo KAYE VALIDATOR NS: 1408016

Anexo 4

Certificación de la Potencia y Registro de apertura y uso de Reactivo LAL MIC-RGT-041 v1 LABORATORIO MICROBIOLOGÍA -TEVA PERÚ

Anexo 5

Formato MIC-RGT-039 v4 “Registro de prueba de endotoxinas bacterianas”. Laboratorio Microbiología -Teva Perú

Anexo 6

Trazabilidad de los resultados del análisis de detección de endotoxinas

RESUMEN:

Las condiciones de esterilización recomendadas por el Ministerio de Salud- Perú en el “Manual de Desinfección y Esterilización -2021” son de 121°C por 15 minutos y 134°C por 3 minutos, la biocarga de los materiales hospitalarios a esterilizar incluyen bacterias Gram-negativas portadoras de endotoxinas bacterianas como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, se desconoce si la muerte celular inducida por el vapor mediante la alteración de las estructuras celulares y la coagulación de las proteínas durante la esterilización por autoclave pueda generar la liberación de endotoxinas resistentes a la esterilización que puedan causar efectos que incluyen fiebre, escalofríos, neumonitis tóxica, síntomas respiratorios y en el peor de los casos shock sépticos sobre pacientes con estancia hospitalaria usuarios de estos materiales esterilizados, estos materiales incluyen equipos de curación, equipos de sutura, instrumentación quirúrgica, ropa para sala de operaciones, campos simples y fenestrados, apósitos, etc. Se detectó por el método de Gel-Clot la liberación de endotoxinas bacterianas de inóculos estandarizados de *E.coli* ATCC8739 y *S. enterica* ATCC 14028 dispuestos dentro de materiales hospitalarios tras esterilización por autoclave a 121°C por 15 minutos y 134°C por 3 minutos. Los resultados evidencian que en todos los inóculos *E.coli* y *S. enterica* sometidos a procesos de esterilización ya sea a 121°C y 134°C se detectó resultados positivos para la liberación de endotoxinas con porcentajes de positividad que varían entre el 11.1% hasta 88.9%, respectivamente; aumentando el porcentaje de positividad de la liberación de endotoxinas en función de la temperatura esterilización y sin impacto por el tipo de bacteria Gram-negativa sometida a esterilización.

Palabras clave

Esterilización, endotoxinas, Gel-Clot, *E.coli* ATCC8739, *S. enterica* ATCC 14028.

ABSTRACT:

The sterilization conditions recommended by the Ministry of Health - Peru in the "Disinfection and Sterilization Manual -2021" are 121 ° C for 15 minutes and 134 ° C for 3 minutes, the bioburden of the hospital materials to be sterilized include pathogenic Gram-negative bacteria carriers of bacterial endotoxins such as *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*, it is unknown whether steam-induced cell death by altering cellular structures and protein coagulation during autoclave sterilization can generate the release of sterilization-resistant endotoxins that can cause effects including fever, chills, toxic pneumonitis, respiratory symptoms and in the worst case septic shock on patients with hospital stay users of these sterilized materials, these materials include healing equipment, suture equipment, surgical instrumentation, operating room clothing, simple and fenestrated fields, dressings, etc. The release of bacterial endotoxins from standardized inoculums of *E. coli* ATCC8739 and *S. enterica* ATCC 14028 placed inside hospital materials after autoclaving at 121°C for 15 minutes and 134°C for 3 minutes was evaluated by the Gel-Clot method. The results show that all *E. coli* and *S. enterica* inocula subjected to sterilization processes at either 121°C or 134°C showed positive results for endotoxin release, with positivity rates ranging from 11.1% to 88.9%, respectively; the positivity rate for endotoxin release increased depending on the sterilization temperature and was not affected by the type of Gram-negative bacteria subjected to sterilization.

Keywords:

Sterilization, endotoxins, Gel-Clot, *E. coli* ATCC8739, *S. enterica* ATCC 14028

1.-INTRODUCCIÓN

La esterilización es un proceso mediante el cual se logra la eliminación de todo microorganismo viable presente en un material incluyendo esporas bacterianas, uno de los métodos más usados es el autoclavado por vapor saturado (1). Las endotoxinas son estructuras ancladas a la membrana celular externa de las bacterias Gram-negativas, son particularmente estables al calor y su liberación se produce tras la muerte o lisis celular (2). La muerte celular inducida por la esterilización no elimina necesariamente las bacterias muertas, y puede albergar residuos bacterianos como el LPS en los materiales esterilizados. (26). Schneier (2020) (3) indica que la liberación de endotoxinas se produce tras la muerte de una bacteria Gram-negativa, durante la producción de productos biofarmacéuticos recombinantes. La presencia de endotoxinas bacterianas en materiales esterilizados de hospitales puede generar problemas serios de salud en personas usuarias de estos materiales, estos efectos se incluyen fiebre, escalofríos, neumonitis tóxica, síntomas respiratorios (7) y en el peor de los casos shock séptico el cual desencadena una reacción inflamatoria severa con subsecuente disfunción orgánica fatal representando hasta un 46% como causa terminal de muerte de pacientes hospitalizados (24).

La biocarga de los materiales hospitalarios a esterilizar incluyen bacterias Gram-negativas portadoras de endotoxinas bacterianas las cuales representan el 60.4% del total de microorganismos aislados en pacientes hospitalizados, de los cuales *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* representan un 35.4% (25), si bien es cierto se utilizan controles de calidad de rutina como indicadores biológicos durante los procesos de esterilización, estos no incluyen indicadores de la presencia de endotoxinas y por lo tanto se desconoce si bajo las condiciones de esterilización en autoclave recomendadas, de 121°C por 15 minutos y 134°C por 3 minutos por el Ministerio de Salud –Perú se induce la liberación de endotoxinas bacterianas por muerte celular.

En este estudio se detectó la presencia de endotoxinas bacterianas inducidas por muerte celular de *Escherichia coli* ATCC8739 y *Salmonella enterica* ATCC 14028 tras la esterilización por autoclave bajo las condiciones recomendadas por el Ministerio de Salud –Perú.

2.-ANTECEDENTES

Tras la muerte de una bacteria Gram-negativa, durante la elaboración de productos biofarmacéuticos recombinantes, las endotoxinas (también conocidas como lipopolisacáridos, LPS) ubicadas en la membrana celular externa bacteriana son liberadas en el lisado donde pueden interactuar y formar enlaces con biomoléculas, estos pueden incluir los compuestos terapéuticos objetivos. Esto es especialmente cierto para los productos biofarmacéuticos producidos con bacterias Gram-negativas, donde la contaminación por endotoxinas es una preocupación. (3). Los procedimientos de ruptura celular para la recuperación de biomoléculas de interés conducen a la liberación de gran cantidad de endotoxinas de tipo LPS es así que la presencia de pequeñas cantidades de endotoxina en las preparaciones de proteína recombinante puede causar efectos secundarios como shock por endotoxina, daño tisular e incluso la muerte del organismo huésped. (4).

La muerte celular inducida por la esterilización mediante vapor de agua no elimina necesariamente las bacterias muertas, y puede albergar residuos bacterianos como el LPS en los materiales esterilizados (26). En un entorno de laboratorio, diferentes fuentes pueden introducir la contaminación por endotoxinas en los productos médicos, incluidos el material de vidrio, los reactivos químicos, las materias primas, los tampones y el proceso de manipulación, ya que las endotoxinas prevalecen en el agua del grifo, el aire y los dedos. Por lo tanto, la contaminación por endotoxinas es difícil de evitar y no se puede ignorar durante el proceso de fabricación, lo que agrega una gran complejidad a la medición de endotoxinas en una amplia gama de circunstancias. (5). Las endotoxinas pasan fácilmente a través de los poros de 0,2 μm de los filtros de membrana sin carga, dado que las endotoxinas tienen carga negativa, la membrana cargada positivamente

montada en un filtro puede ayudar a eliminar las endotoxinas, aunque estas moléculas sean más pequeñas que el tamaño de los poros del filtro. (6).

La endotoxina es un potente agente inflamatorio con reconocidos efectos sobre la salud, que incluyen fiebre, escalofríos, neumonitis tóxica, síntomas respiratorios (7) y en el peor de los casos shock séptico el cual desencadena una reacción inflamatoria severa con subsecuente disfunción orgánica fatal representando hasta un 46% como causa terminal de muerte de pacientes hospitalizados (24).

La exposición a la endotoxina también puede cambiar significativamente el recuento de glóbulos blancos del cuerpo, lo que resulta en problemas de la función inmunológica. La exposición a endotoxinas puede alterar los niveles circulantes de marcadores de respuesta inflamatoria e inmunológica que pueden estar implicados en la carcinogénesis pulmonar, se sugiere que el polvo que contiene endotoxinas bacterianas tiene un impacto significativo en la salud provocando problemas respiratorios. (8). Se midieron los efectos de tres tipos de endotoxinas LPS de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Klebsiella pneumoniae* en ratas albinas macho adultas. Las células de la médula ósea mostraron cambios; los parámetros hematológicos y los valores bioquímicos de estos efectos pueden deberse a la disfunción de órganos biológicos como la médula ósea, el hígado, los riñones, el corazón y el páncreas. (9).

3.-MARCO TEÓRICO

3.1 Esterilidad:

La esterilidad es el nivel de inactivación bacteriana, entendida como la ausencia de microorganismos viables. El nivel de esterilidad usualmente está representado en una función exponencial del “Nivel de aseguramiento de esterilidad” o SAL (10). Para lograr una esterilidad es necesario alcanzar 6 reducciones logarítmicas de la semivida de biocarga inicial (SAL de 10^{-6}), esta expresión nos indica que la probabilidad de detectar una partícula viable luego del proceso de esterilización de 1 en 1 millón. La esterilidad alcanzada por medio de un proceso de autoclavado debe someterse a procesos de calificación y validación con el objetivo de garantizar la obtención de resultados confiables y reproducibles de esterilidad (10,11).

3.2 Esterilización con calor húmedo (vapor)

La humedad en el vapor tiene un gran impacto en su capacidad para desnaturalizar o coagular proteínas; de ahí la importancia de utilizar vapor saturado. El vapor saturado está en equilibrio con el agua calentada a la misma presión, lo que significa que contiene la máxima cantidad de humedad sin condensación líquida presente. Se recomienda vapor saturado para la esterilización por vapor. No todo el vapor es aceptable para usar en una autoclave. Se recomienda un suministro exclusivo de vapor limpio. Debe evitarse el vapor sobrecalentado, el vapor que contenga un exceso de agua líquida y el vapor que contenga un exceso de aditivos para calderas o contaminantes (como óxido). El vapor sobrecalentado se define como vapor que está por encima de su temperatura de saturación. El sobrecalentamiento ocurre en los sistemas de distribución de vapor cuando la presión de la línea cae a través de una válvula reductora de presión (PRV) Cuanto mayor sea la caída de presión, más sobrecalentamiento se crea. El vapor sobrecalentado no contiene la

humedad necesaria para asegurar la esterilización. El exceso de energía en el vapor sobrecalentado es transitorio y finalmente es disipado por los artículos en la cámara del esterilizador, pero puede causar dificultades cuando se califica el esterilizador para los requisitos de estabilización de temperatura de la cámara vacía de la norma europea (13).

El sistema de vapor limpio ideal para esterilizadores de vapor se regula a más de 2,0 a 2,5 bar (30 a 35 psig) en la fuente. Se indica que la presión de suministro de vapor no debe ser más del doble de la presión de la cámara a la temperatura deseada. El sobrecalentamiento también se crea cuando el vapor saturado pasa sobre una superficie a una temperatura más alta. La temperatura de la camisa del esterilizador siempre debe ajustarse ligeramente por debajo de la temperatura de esterilización de la cámara para evitar el sobrecalentamiento del vapor al entrar en la cámara. Una autoclave alimentada con vapor sobrecalentado funcionará como un esterilizador de calor seco, en el que la eliminación de microorganismos es menos eficiente que el vapor saturado óptimo requerido para la esterilización. El proceso de esterilización por calor seco lleva mucho más tiempo incluso a temperaturas más altas que la esterilización por vapor. El vapor mata los microorganismos mediante la transferencia de energía, lo que provoca la alteración de las células y la coagulación de las proteínas.

El vapor también proporciona el agua necesaria para que se produzcan estas reacciones. Este proceso es muy eficiente ya que el vapor contiene dos fuentes de calor (energía), es decir, calor sensible; 4 kJ por kilogramo por grado centígrado: energía térmica que eleva la temperatura del agua entre sus puntos de congelación y ebullición. (14), calor latente; 2260 kJ por kilogramo en el punto de condensación - Energía térmica que cambia el agua de líquido a gas. Es este calor latente lo que hace que el vapor sea tan eficiente como medio de transferencia de energía. Se libera a medida que el vapor se condensa en

superficies más frías. En una autoclave, el condensado formado se puede drenar y la presión de la cámara se reduce, lo que permite que entre más vapor y que su energía esté disponible (15)

3.2.1 Ciclos básicos de esterilización por vapor:

Los ciclos de esterilización por vapor suelen constar de tres fases:

Preacondicionamiento: durante esta fase se elimina el aire de la cámara y se humedece la carga mediante pulsos alternos de vacío y presión positiva de vapor.

Exposición: durante esta fase, la temperatura de la cámara se eleva y se mantiene en la temperatura de esterilización programada durante el tiempo de exposición programado (ambos son seleccionables por el usuario). La exposición también puede controlarse mediante F_0 acumulado para líquidos si se utilizan una sonda de carga y controles de esterilización apropiados. Cabe señalar que F_0 es un parámetro que cuantifica la letalidad del proceso de esterilización y se expresa en tiempo.

Post-acondicionamiento: durante esta fase, las cargas de productos secos se enfrían y se secan mediante un pulso o pulsos de vacío o se enfría una carga de líquidos. La presión de la cámara se lleva a la atmosférica. Los ciclos de esterilización pueden ser modificados acuerdo a las aplicaciones teniendo en cuenta fundamentalmente la carga identificada (12).

3.2.2 Factores críticos del autoclavado:

Tiempo: El tiempo de exposición es un factor crítico, un tiempo inadecuado puede determinar la falla del proceso, se debe considerar un control estricto del cumplimiento del mismo.

Temperatura: La temperatura determina el grado de penetración de calor transferido al material, a mayor temperatura mayor es la probabilidad de provocar la muerte celular. La temperatura es directamente proporcional a la presión. Un ciclo típico a 121 °C (250 °F) requerirá de 1,03 a 1,17 bar g (15 a 17 psi)

Resistencia: Es el grado inherente de resistencia cada grupo celular a la destrucción. Este puede ser medido con el valor “D” que es expresado como el tiempo en minutos para poder reducir la población en un logaritmo.

3.3 Enterobacterias productoras de endotoxinas

Las enterobacterias son consideradas por la WHO (World Health Organization) en su lista de prioridad de patógenos bacterianos del 2024 como un grupo de interés crítico debido a su alta resistencia a cefalosporinas de tercera generación y carbapens, dentro de este grupo existen diferentes bacterias Gram negativas productoras de endotoxinas algunas de ellas como *E.coli* y *S.enterica*, tienen una alta relevancia clínica debido a su virulencia y toxicidad de sus endotoxinas. Para el caso de *E.coli* ésta se encuentra presente principalmente en el intestino distal de organismos de sangre caliente generando toxinas como por ejemplo la toxina “shiga” que puede desencadenar graves enfermedades como el síndrome hemolítico urémico (27). Por otro lado, *Salmonella* es una de las cuatro principales causas de enfermedad diarreica, específicamente la salmonelosis que en algunos casos puede llegar a hacer mortal, se ha reportado serotipos resistentes a los antimicrobianos de primera línea representando un serio problema de salud pública (28).

3.4 Bio-indicadores

Existen diferentes tipos de indicadores: Químicos, físicos y biológicos. Sin embargo, se debe utilizar indicadores biológicos para el control de calidad, debido a que solo este tipo

de indicadores están relacionados directamente con la letalidad del proceso (16,17). Cualquiera sea el indicador biológico a utilizar para la validación, se debe demostrar su idoneidad para el objetivo requerido. Para el ensayo de destrucción en equipos esterilizadores por calor húmedo, a temperatura de 121°C, se debe utilizar indicadores biológicos de concentración no menor de 1×10^5 ni mayor de 5×10^6 esporas, con un valor D₁₂₁ mayor o igual a 1,5 minutos. Cabe mencionar que el valor D es una característica de los bio-indicadores referido al tiempo necesario para que se reduzca en un 90% la población de microorganismos a una determinada temperatura en la mayoría de los casos expresado en 121°C. Cada lote de indicador biológico debe contar con certificado de análisis. Asimismo, el usuario debe verificar lo declarado por el fabricante con respecto a la concentración de esporas. Cuando el indicador biológico es utilizado según las recomendaciones del fabricante, no es necesario confirmar su resistencia. (18).

3.5 Endotoxinas

Son estructuras ancladas a la membrana celular externa de las bacterias GRAM negativas, están constituidas principalmente por un lípido de anclaje (Lípido A) seguido de una cadena de polisacáridos (estas pueden ser usadas para su diferenciación). Las endotoxinas de manera general son denominadas como LPS (19,20,21). Las endotoxinas permiten formar una barrera contra el ingreso de moléculas pequeñas e hidrofóbicas. La mayoría de ellas están cargadas negativamente ayudando a estabilizar la membrana celular externa. La toxicidad esta atribuida a la presencia del lípido A mientras que la cadena de polisacáridos representa una estructura altamente inmunogénica. (19).

Las endotoxinas son estables al calor, sobre todo al calor húmedo, el calor transferido y acumulado durante los procesos de esterilización no permite su inactivación. Para lograr esta inactivación es necesario alcanzar temperaturas más altas por medio de un horno de

calor seco. La detección de endotoxinas tiene relevancia clínica debido a que representan señales de infección por el sistema inmunitario, la presencia de endotoxinas provoca respuestas inmunitarias inflamatorias potencialmente mortales. (19)

3.6 Método Gel-Clot

El método LAL (Limulus Amebocyte Lisate) se fundamenta en la afinidad de las endotoxinas por el Factor C presente en los amebocitos de Limulus esta interacción activa a este factor C el cual va desencadenar una reacción en cascada culminando con la formación de un coágulo (presencia de coagulina). A esta reacción se le puede añadir un sustrato cromógeno para mejorar la visibilidad del producto generado. (22) La sensibilidad del grado de detección del método de Gel-Clot (Límite de detección) debe estar entre 2λ y 0.5λ (2)

3.7 Condiciones de esterilización – Ministerio de Salud - Perú

En el documento Técnico “Manual de Desinfección y Esterilización -2021” – RD_183_2021_D_HNDM. 2021. Ministerio de Salud Perú (1), se establecen las siguientes condiciones de esterilización para los procesos de autoclavado:

- 121°C y 16 psi por 15 minutos
- 134°C y 30 psi por 3 minutos

Se establecieron dos condiciones con diferentes condiciones térmicas debido a la variabilidad de resistencia térmica de los materiales a esterilizar es así que materiales como el látex, caucho o silicona se pueden deformar a tiempos largos de esterilización.

4.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel hospitalario de Perú se utilizan controles de calidad como indicadores biológicos en las cargas de esterilización para 121°C por 15 minutos y 134°C por 3 minutos, con lo cual se controla que los procesos sean estériles, sin embargo, los controles de calidad actuales de esterilización como bio-indicadores de *Bacillus stearothermophilus* no tienen alcance sobre los residuos bacterianos resistentes al calor húmedo como endotoxinas en las cuales para su detección pueden usarse métodos biológicos como el Gel-Clot. La muerte celular inducida por el vapor mediante la alteración de las estructuras celulares y la coagulación de las proteínas durante la esterilización por autoclave puede generar la liberación de endotoxinas resistentes a la esterilización. Así también se ha reportado la liberación de endotoxinas tras la muerte de una bacteria Gram-negativa, durante la producción de productos biofarmacéuticos recombinantes, estos incluyen esterilizaciones, filtración esterilizante, etc, esto aún más posible en un ambiente hospitalario donde la presencia de bacterias Gram-negativas portadoras de endotoxinas bacterianas representan el 60.4% del total de microorganismos aislados (25). La presencia de endotoxinas bacterianas en materiales esterilizados puede generar problemas serios de salud en personas usuarias de estos materiales, de acuerdo a Lundin J.(2009) (7), estos efectos se incluyen fiebre, escalofríos, neumonitis tóxica, síntomas respiratorios y en el peor de los casos shock séptico el cual desencadena una reacción inflamatoria severa con subsecuente disfunción orgánica fatal representando hasta un 46% como causa terminal de muerte de pacientes hospitalizados (24), razón por cual se plantea ejecutar el presente trabajo para la detección de posibles endotoxinas liberadas por muerte celular tras la esterilización para cada una de las condiciones recomendadas por el Ministerio de Salud – Perú.

5.-JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Este trabajo pretende ampliar los conocimientos sobre como la esterilización por autoclave bajo las condiciones 121°C por 15 minutos y 134°C por 3 minutos pueden favorecer la liberación de endotoxinas .Siendo el autoclavado un procedimiento rutinario no sólo en el ámbito hospitalario/clínico si no también sectores como la industria farmacéutica y la biofarmacéutica en los cuales tampoco existe un control de endotoxinas tras la esterilización, es así que los resultados de este trabajo pueden ser tomados como base para establecer medidas de control y mitigación sobre una potencial contaminación de endotoxinas por muerte celular inducida por calor húmedo, que el caso del ambiente hospitalario generan cuadros clínicos graves de shock séptico que representan hasta en un 46% de muerte debido a esta causa.

6.-HIPÓTESIS

En la esterilización mediante autoclave realizada bajo las condiciones recomendadas por el Ministerio de Salud- Perú se detecta la liberación de endotoxinas bacterianas de inóculos estandarizados dispuestos dentro de materiales hospitalarios.

7.-OBJETIVOS

7.1 Objetivo general:

Detectar la liberación de endotoxinas bacterianas de inóculos estandarizados dispuestos dentro de materiales hospitalarios por inducción del proceso de autoclavado bajos las condiciones recomendadas por el Ministerio de Salud-Perú.

7.2 Objetivos específicos:

Determinar la concentración bacteriana de inóculos *E. coli* ATCC8739 y *S. enterica* ATCC 14028.

Ejecutar la prueba de distribución de calor inicial de la cámara de la autoclave a 121°C y 134°C y verificar que la temperatura de esterilización se mantenga homogénea en cada ciclo de esterilización usado.

Evaluar la presencia de endotoxinas bacterianas de inóculos estandarizados de *E. coli* ATCC8739 y *S. enterica* ATCC 14028 mediante el método Gel clot antes de ser sometidas a un proceso de esterilización.

Evaluar la presencia de endotoxinas bacterianas de inóculos estandarizados *E. coli* ATCC8739 y *S. enterica* ATCC 14028 dispuestos dentro de materiales hospitalarios mediante el método Gel clot después de la esterilización en autoclave bajo la condición de 121°C por 15 minutos.

Evaluar la presencia de endotoxinas bacterianas de inóculos estandarizados *E. coli* ATCC8739 y *S. enterica* ATCC 14028 dispuestos dentro de materiales hospitalarios mediante el método Gel clot después de la esterilización en autoclave bajo la condición de 134°C por 3 minutos.

Comparar en función de la condición térmica (121°C y 134°C) y tipo de inóculo estandarizado (*E. coli* ATCC8739 y *S. enterica* ATCC 14028) el porcentaje de positividad para la liberación de endotoxinas.

8.- METODOLOGÍA

8.1 Diseño de estudio:

Es un diseño descriptivo observacional transversal, el estudio fue desarrollado en un ambiente simulado en Laboratorios Farmacéutico Transnacional TEVA Perú, ubicado en la Avenida La Molina 135 Ate- Lima -Perú, TEVA Perú cuenta con certificación en Buenas Prácticas de Manufactura y Buenas Prácticas de Laboratorio incluyendo estudios microbiológicos.

El estudio realizado es una medición indirecta de la liberación de endotoxinas sobre los materiales hospitalarios, debido a medidas de bioseguridad propias del laboratorio ejecutante y materiales hospitalarios, se usaron viales sellados con inóculos estandarizados de *E. coli* ATCC8739 y *S. enterica* ATCC 14028 introducidos dentro de las cargas de materiales hospitalarios tales como ropa estéril, equipos de sutura, apósitos e instrumentación quirúrgica, esta condición nos permite evaluar de manera controlada y segura el efecto de la inducción de la esterilización por autoclave sobre la liberación de las endotoxinas presentes en la estructura celular de los inóculos, mitigando el riesgo de contaminación por endotoxinas liberadas sobre la superficie del autoclave y materiales hospitalarios reutilizables como equipos de sutura e instrumentación quirúrgica.

8.2 Características de la autoclave:

MARCA	FEDEGARI
MODELO	F05 / Tipo Horizontal
NÚMERO DE SERIE	NF-1039
CAPACIDAD INTERNA (ESPACIO)	3900 L
PRESIÓN DE OPERACIÓN	0,35 a 35 PSI
TEMPERATURA DE OPERACIÓN	100 °C - 121 °C

8.3 Principio de funcionamiento:

El equipo opera haciendo uso del suministro de vapor generado por el Caldero de Vapor. Cuenta con 01 (un) controlador lógico programable (PLC) utilizado para controlar de manera automática los distintos procesos que se llevan a cabo en el equipo junto con sus variables críticas tales como temperatura, tiempo y presión. Está diseñado para operar dentro de rangos de presión, temperatura y tiempo (variables críticas) previamente definidos. Los valores asignados a cada una de las variables críticas están indicados en cada una de las recetas previamente almacenadas en el PLC, las cuales pueden ser descargadas/grabadas desde el software SCADA (Supervisory Control and Data Acquisition) por el operador cada vez que se requiera iniciar un ciclo de esterilización. El ciclo de esterilización está dividido en 04 (cuatro) etapas: 1) Calentamiento de chaqueta; 2) Recalentamiento; 3) Esterilización y; 4) Secado.



Figura 1.- Vista frontal de autoclave Fedegari 03-073

8.4 Operacionalización de las variables:

La operacionalización de las variables se indican en la Tabla 1.

Tabla 1.-Operacionalización de las variables

Variable	Definición Teórica	Definición operativa	Dato	Tipo Estadístico	Instrumento
Independiente	Parámetros del ciclo de esterilización	Temperatura y tiempo	Parámetro 1 (121°C x 15 minutos) Parámetro 2 (134°C x 3 minutos)	Cualitativo nominal dicotómica	Termómetro PT100 Cronómetro
Dependiente	Presencia de Endotoxinas bacterianas	Formación de Coagulo	Positivo (+) Mayor a 0.015 EU/mL Negativo (-) Menor a 0.015 EU/mL	Cualitativo nominal dicotómica	Visual

Nota 1: 0.015 EU/mL representa el menor valor de sensibilidad posible de la prueba para obtener un resultado positivo.

Nota 2: La variable independiente es cualitativa debido a que representa dos posibles categorías sin orden de jerarquía (Parámetro 1 o Parámetro 2)

8.5 Tamaño de muestra:

Para el cálculo del tamaño de muestra se consideró que los resultados se expresan en términos de proporción (variable dicotómica), para poder obtener el valor de la muestra se consideró: Debido a que se desconoce la prevalencia de la presencia de endotoxinas bacterianas inducidas por esterilización se asume un tamaño de muestra con una prevalencia simétrica alrededor del 50%, así también se asume un error absoluto de muestreo del 5%. Se hizo uso del software Epidat.4.2 para el cálculo del tamaño de muestra:

[1] Tamaños de muestra. Proporción:

Datos:

Tamaño de la población:	∞
Proporción esperada:	50,000%
Nivel de confianza:	95,0%
Efecto de diseño:	1,0

Resultados:

Precisión (%)	Tamaño de la muestra
5,000	385

El tamaño de muestra resultó 385 viales conteniendo a las bacterias *E.coli* y *S. enterica* los cuales serán distribuidos de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2.-Tamaño de muestras y grupos

Condición de esterilización	Inóculo	Muestra (viales)		Grupos
Sin esterilización	<i>E. coli</i>	198	99	11 ciclos por 9 viales
Sin esterilización	<i>S. enterica</i>		99	11 ciclos por 9 viales
121 °C x 15 min	<i>E. coli</i>	198	45	5 ciclos por 9 viales
121 °C x 15 min	<i>S. enterica</i>		54	6 ciclos por 9 viales
134°C x 3 min	<i>E. coli</i>		54	6 ciclos por 9 viales
134°C x 3 min	<i>S. enterica</i>		45	5 ciclos por 9 viales

8.6 Distribución de los viales por cada grupo:

La totalidad de ubicaciones para un volumen de ocupación máximo, considerando 8 vértices de un cubo más un punto central fue de 9, de esta manera todo el volumen interno de la cámara de la autoclave fue cubierto con 9 viales (la autoclave es de tipo cúbica). Se tomó el criterio de distribución de sensores para calibración de medios isotérmicos del procedimiento PC-018 “Procedimiento para la calibración o caracterización de medios termostáticos con aire como medio termostático” de INDECOPI 2009. (23)

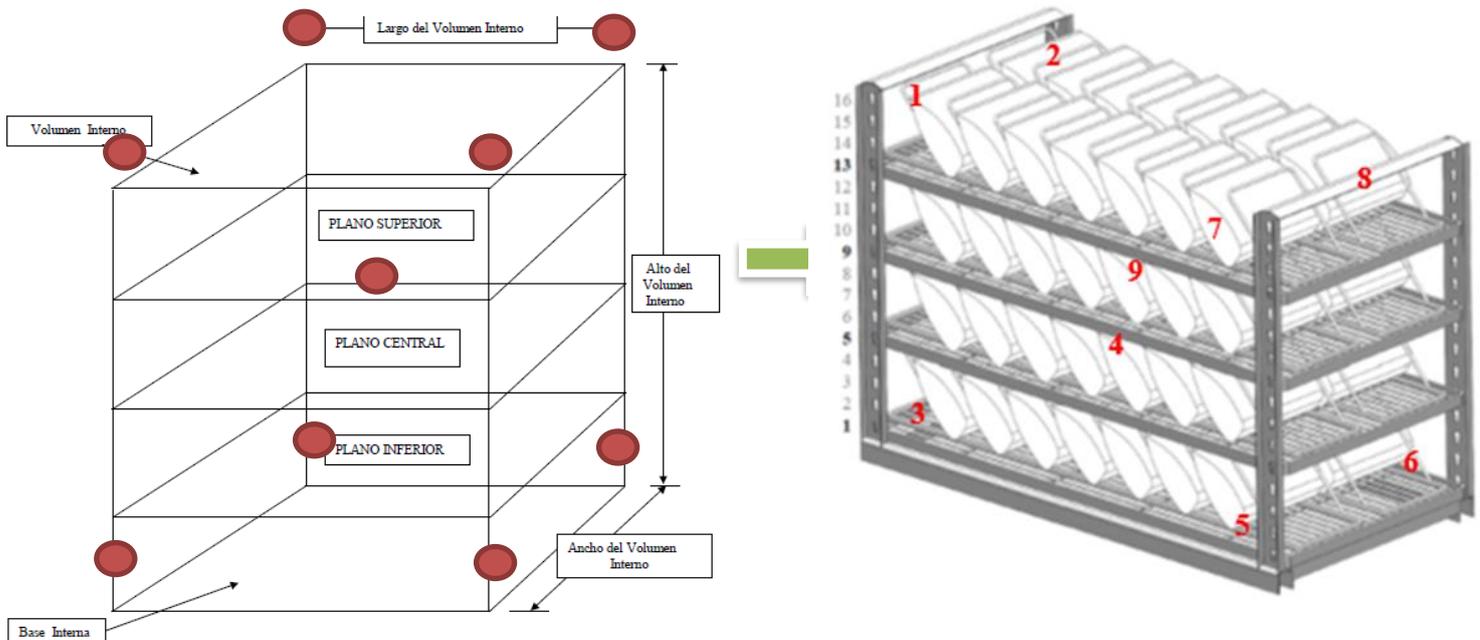


Figura 2.-Plano de distribución – grupo

8.7 Preparación de inóculos estandarizados:

Cepa de *E. coli*: Número de referencia: ATCC 8739; lote: 483-1306; fecha de expiración: 2024-12-31; fuente: Microbiologics.

Cepa de *Salmonella enterica*: Número de referencia: ATCC14028; lote: 363-621;

fecha de expiración: 2024-09-30; fuente: Microbiologics.

Las cepas *E. coli* y *S. enterica*, fueron cultivadas en agar TSA inclinado e incubados por 48 h, a 32,5 °C +/- 2,5 °C. Luego, las células bacterianas fueron suspendidas y homogenizadas en 10 mL de solución amortiguadora pH 7.2 estéril en un vial estéril. Este proceso fue replicado hasta la obtención de 198 inóculos de *E. coli* y 198 de *S. enterica*. La concentración bacteriana de los inóculos preparados fue determinada mediante la lectura de transmitancia en el espectrofotómetro (Modelo: 4001/4 NS: 35GC297037 código interno ESPEC-08) a una longitud de onda de 600 nm, considerando que para *E. coli* los valores de transmitancia entre T% 58 a 62 equivalen a 3.0×10^8 ufc/mL y para *S. enterica* los valores de transmitancia entre T% 58 a 62 equivalen a 1.6×10^8 ufc/mL, estas especificaciones en base al procedimiento interno validado del laboratorio ejecutante TEVA Perú S.A. (Ver Anexo 1 “Reporte de validación del método microbiológico para el procedimiento de estandarización de inóculo RV-(MIC-INS-012-02)-00 aprobado el 2017-11-08”. Los valores de transmitancia nos permitieron estandarizar los inóculos por medio de la lectura de luz que no es absorbida por los inóculos y es captada por el equipo traducida en porcentaje. Los resultados fueron reportados en el formato CDC-RGT-011 v7 “Registro de uso de Equipos” Lectura de transmitancia – Inóculos *E. coli* y *S. enterica*. Laboratorio Microbiología -Teva Perú. Ver Anexo 2.

8.8 Envasado de inóculos de cepas *E.coli* y *S.enterica*:

Ciento noventa y ocho viales con inóculos de *E.coli* (3.0×10^8 ufc/mL) y 198 viales de *S.enterica* (1.6×10^8 ufc/mL) fueron envasados usando la técnica del piro sellado (figura 3) en viales en el área estéril (figura 4) del Laboratorio De Teva Perú (Fecha 2024-09-25).

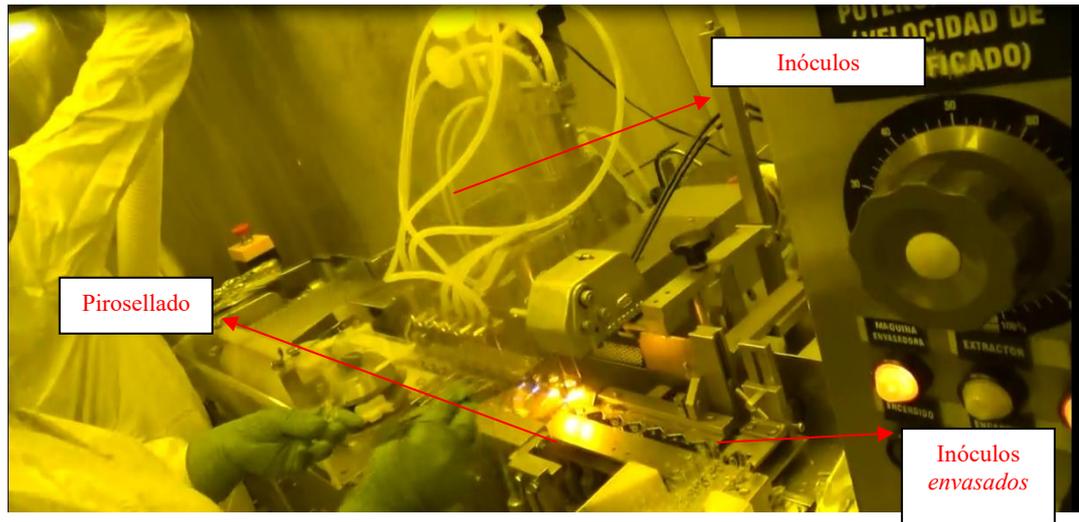


Figura 3.-Proceso de envasado de inóculos

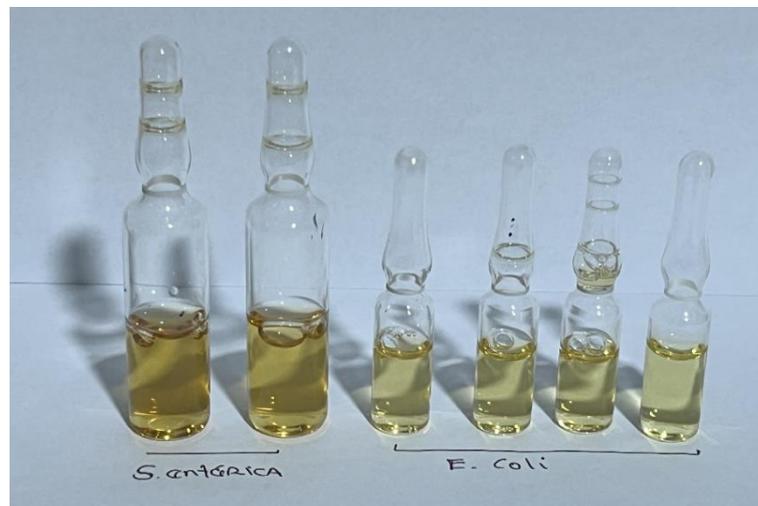


Figura 4.-Viales con inóculos

La distribución de los viales envasados fue el siguiente:

- 99 viales con *E.coli* y 99 viales con *S. enterica* no fueron esterilizados y procesadas para el análisis de endotoxinas directamente.
- 45 viales con *E.coli* y 54 viales con *S. enterica* fueron esterilizados a 121°C x 15 minutos.
- 54 viales con *E.coli* y 45 viales con *S. enterica* fueron esterilizados a 134°C x 3 min

8.9 Prueba de distribución de calor:

Las dos condiciones de esterilización se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.-Configuración del proceso de esterilización

NOMBRE DE RECETA	CONFIGURACIÓN DE CICLO PROGRAMADO					RANGO DE PRESIÓN (psi)
	CALENTA. DE CHAQUETA (s)	PRE-CALENTAMIENTO (min)	ESTERILIZACIÓN (°C x min)	SECADO (min)	PRESIÓN N (psi)	
121°C x 15 min	2 s	5 min	121°C x 15 min	15 min	16 psi	13,0 – 16,2 psi
134°C x 3 min	2 s	5 min	134°C x 3 min	5 min	18 psi	27.0 – 32,0psi

La prueba de distribución de calor en cámara vacía indica que todas las ubicaciones dentro del autoclave mantienen una temperatura y presión de esterilización estable, garantizando que al ubicar las ampollas de los inóculos de bacterias en diferentes ubicaciones de la carga estén sometidas a las mismas condiciones estables de temperatura. Para este proceso fueron usados sensores tipo K unidos a un instrumento de adquisición de datos para validación térmica Marca Kaye, modelo X2015, número de serie: 20080023 y el sensor patrón Sensor Patrón Modelo M2801 / IRTD-400, número de Serie: F0501 Los sensores de temperatura fueron ubicados en las posiciones indicadas en la figura 5, tras los cuales se ejecutaron 3 ciclos de esterilización para evaluar su distribución de calor.

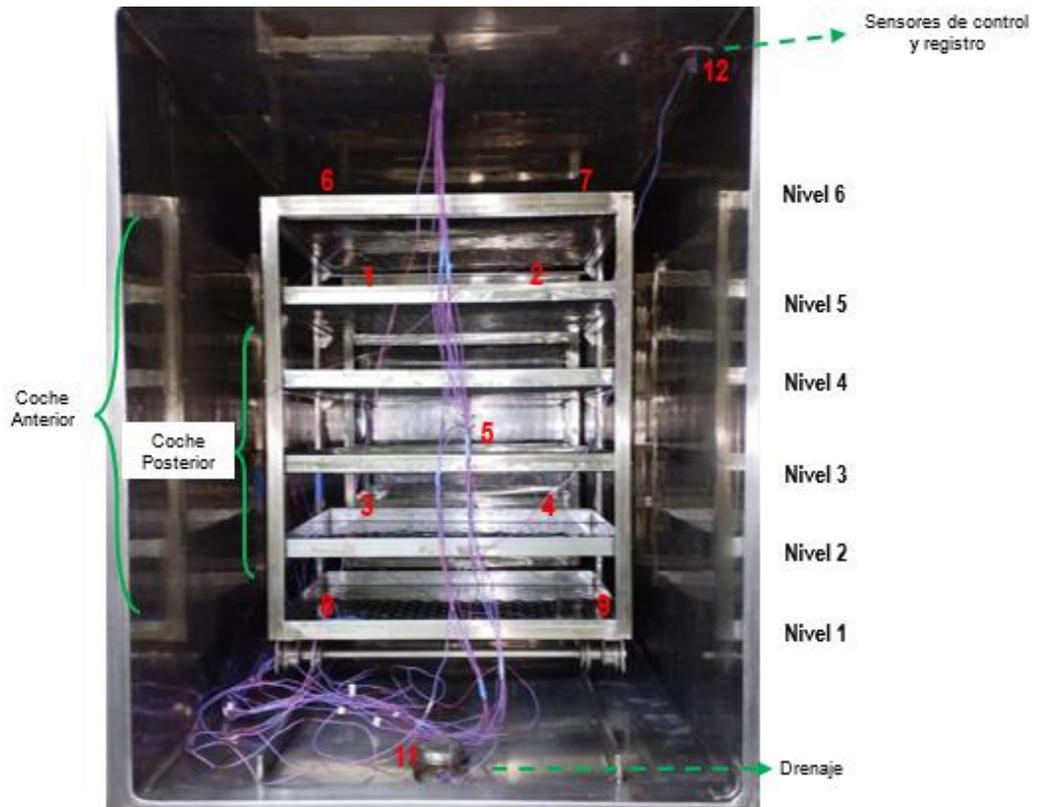


Figura 5.-Distribución de sensores- cámara vacía de autoclave

8.10 Carga hospitalaria:

La carga hospitalaria usada para los procesos de esterilización constó de:

- ✓ Uniformes estériles
- ✓ Equipos de curación
- ✓ Instrumentación quirúrgica y equipos de sutura
- ✓ Campos simples y fenestrados y apósitos

La distribución de los sensores e inóculos dentro de la carga hospitalaria en cada ciclo de esterilización se muestra en la Tabla 4. En cada posición se agregó dentro de un material hospitalario: 1 sensor de temperatura y 1 vial de inóculo de *E. coli* o *S. enterica*

Tabla 4.-Ubicación de sensores dentro de carga hospitalaria

Carga Hospitalaria	Sensor	Nivel	Posición
Apósitos	01	1	Adelante; izquierda; dentro de apósitos
Campos simples y fenestrados.	02	1	Adelante; derecha; dentro de campos simples y fenestrados.
Equipo de curación	03	5	Adelante; izquierda; dentro equipo de curación
Uniformes estériles	04	5	Atrás; derecha; dentro de uniformes estériles
Ropa de sala de operaciones	05	2	Adelante; derecha; dentro de ropa de sala de operaciones
Instrumentación quirúrgica	06	2	Atrás; izquierda; dentro de instrumentación quirúrgica
Equipo de sutura	07	6	Atrás; izquierda; dentro de equipos de sutura
Equipos de sutura	08	6	Atrás; derecha; dentro de equipos de sutura
Uniformes estériles	09	3	Adelante; derecha; dentro de uniformes estériles



Figura 6 -Distribución de sensores e inóculos dentro de la carga hospitalaria

8.11 Esterilización de inóculos:

La cantidad de ciclos y viales por tipo de inóculo se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5.-Distribución de ciclos de esterilización por tipo de inóculo

Condición de esterilización	Inóculo	Muestra		
121 °C x 15 min	<i>E. coli</i> (3.0 x 10 ⁸ ufc/mL)	198 viales	99 viales	45 viales (5 ciclos por 9 viales)
121 °C x 15 min	<i>S. enterica</i> (1.6 x 10 ⁸ ufc/mL)			54 viales (6 ciclos por 9 viales)
134°C x 3 min	<i>E. coli</i> (3.0 x 10 ⁸ ufc/mL)		99 viales	54 viales (6 ciclos por 9 viales)
134°C x 3 min	<i>S. enterica</i> (1.6 x 10 ⁸ ufc/mL)			45 viales (5 ciclos por 9 viales)

Los procesos de esterilización se indican en la Tabla 6.

Tabla 6.-Fechas de esterilización

Condición	Cepa	Cantidad de Ciclos	Nº ciclo	Cantidad de viales de inóculo	Fecha de Esterilización
Esterilizado 121 °C x 15 min	<i>E. coli</i>	5 ciclos por 9 viales	1	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-09-26
			2	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-09-26
			3	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-09-26
			4	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-09-26
			5	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-09-26
	<i>S. enterica</i>	6 ciclos por 9 viales	1	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-09-26
			2	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-09-26
			3	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-09-27
			4	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-09-27
			5	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-09-27
			6	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-09-27
Esterilizado 134°C x 3 min	<i>E. coli</i>	6 ciclos por 9 viales	1	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-10-01
			2	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-10-01
			3	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-10-01
			4	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-10-01
			5	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-10-01
			6	9 viales de <i>E.coli</i>	2024-10-01
	<i>S. enterica</i>	5 ciclos por 9 viales	1	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-10-01
			2	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-10-01
			3	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-10-01
			4	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-10-01
			5	9 viales de <i>S. enterica</i>	2024-10-01

Los datos de tiempo y temperatura de cada ciclo de esterilización fueron obtenidos de los reportes de esterilización emitidos por equipo KAYE VALIDATOR NS: 1408016 del área Asuntos Técnicos y Científicos -Teva Perú. Ver Anexo 3.

8.12 Análisis de endotoxinas:

Los viales con inóculos sin esterilización y los viales con inóculos obtenidos de los procesos de esterilización fueron sometidos al análisis de endotoxinas por el método Gel Clot.

Método Gel Clot

Para dicho análisis se usaron los siguientes patrones y reactivos:

Control negativo: El control negativo fue 200 µL de agua LAL (agua apirógena); catálogo: WP1001/WP100C; lote: AJ30766296; fecha de expiración: 2026-11-30.

Control positivo: Estándar Endotoxina – *E. coli* (*E. coli strain 055: B5*); lote: EM34942; fecha de vencimiento: Abril-2027; Concentración de trabajo: 5000 EU/5mL, 10EU/ml, 1EU/mL, **20 λ (0.6 EU/mL)**.

Estándar Endotoxina: *Salmonella enterica* (*Salmonella enterica serotype enteritidis – purified by phenol extraction*) lote: L0611; fecha de vencimiento: enero 2027; Concentración de trabajo: 500000 EU/mg, 0.01mg EU/5mL, 10EU/ml, 1EU/mL, **20 λ (0.6 EU/mL)**.

Los controles estándar de endotoxina (CSE) de *E coli* y *S. enterica*, fueron reconstituidos con 5 mL de agua LAL; siendo la concentración de endotoxina por vial 5000 EU/5mL

o 1000 EU/mL (en su defecto diluir hasta 1000 EU/mL). El CSE fue guardado en refrigeración a una temperatura de 2 °C a 8 °C, por no más de 4 semanas después de reconstituido. En el momento de su uso, el CSE fue diluido a una concentración de 20λ de acuerdo a lo indicado en la Tabla 7, donde λ es la sensibilidad del reactivo LAL

Tabla 7.-Diluciones de control positivo

Solución inicial	Agua LAL	Concentración	Solución final
0,1 mL Sol. A	9,9 mL	10 EU/mL	Sol. B
0,5 mL Sol. B	4,5 mL	1 EU/mL	Sol. C
3mL Sol. C	2 mL	0,6 EU/mL	Sol. D (20λ)
0,5 mL Sol. D	4,5 mL	0,06 EU/mL	Sol. E (2λ)

La Sol. D con una concentración de 20λ , fue nuestra dilución de trabajo, 10 μ L de la solución D fue añadido a los controles positivos en cada ensayo

Reactivo LAL: Lote: R1242L; fecha de expiración: noviembre 2026; El tapón del reactivo LAL(Endosafe®) fue abierto lentamente eliminando el vacío, cuidando de no contaminar el vial, se añadió 5,2 mL de Agua LAL y se dejó el vial en reposo a temperatura ambiente hasta que se disuelva por completo por sí solo. Se retiró el tapón y reemplazado por parafilm y quedando listo para su certificación. A partir de la Sol. E, se prepararon tubos despirogenados 10x75 mm por cuádruplicado para cada dilución de control estándar de endotoxina (2λ , λ , $\lambda/2$ y $\lambda/4$) y el control negativo por duplicado, según la figura 7.

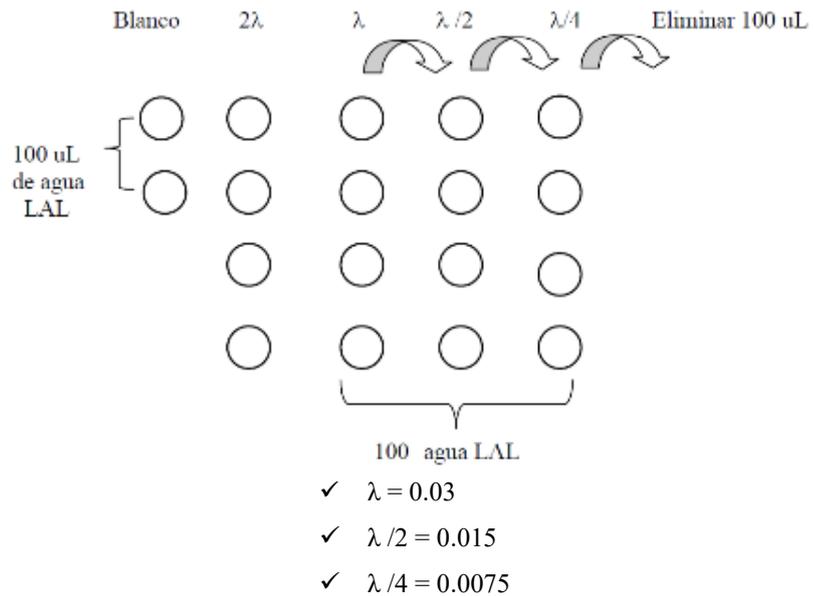


Figura 7. Diluciones de certificación de reactivo LAL

En los primeros cuatro tubos se añadió 100 μ L de la dilución correspondiente al control estándar de endotoxina 2λ y en los otros tubos se añadió 100 μ L de agua LAL. Se realizaron diluciones sucesivas desde λ hasta $\lambda/4$ y de este último se eliminó 100 μ L de la solución. Finalmente, a todos los tubos se adicionaron 100 μ L de reactivo LAL (Endosafe®) con la ayuda de una micropipeta.

Se agitaron los tubos golpeando suavemente la gradilla en la palma de la mano por aproximadamente 10 segundos, luego fueron llevados a baño maría $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 ± 2 min, para finalmente leer los resultados según lo siguiente:

Formación de coágulo (+)

No formación de coágulo (-)

Se calculó la sensibilidad determinando el promedio geométrico del valor de las sensibilidades (PGS):

Antilog (Sumatoria log sensibilidades)

$$\text{PGS} = \frac{\quad}{4}$$

La potencia calculada del reactivo LAL fue de: **PGS: 0.03 EU/mL**, cumpliendo lo requerido 2λ (0.06), $\geq \text{PGS} \geq \lambda/2$ (0.015) confirmando la sensibilidad del reactivo conforme. (Ver Anexo 4).

Análisis de endotoxinas de los inóculos sin esterilizar y esterilizados:

Los viales fueron homogenizados usando un vórtex por un minuto e incubados a temperatura ambiente por 1 minuto, 0,1 mL del contenido de un vial y 0,1 mL de reactivo LAL (Endosafe®) fueron mezclados en un nuevo tubo. La mezcla fue homogenizada golpeando los tubos en la palma de la mano por aproximadamente 10 segundos y fueron llevados a baño maría $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 ± 2 min, tras la cual se leyeron los resultados según lo siguiente:

Formación de coágulo (+)

No formación de coágulo (-)



Figura 8.- Resultado positivo para la formación de coágulo

Los análisis de endotoxinas se llevaron en las fechas indicadas en la Tabla 8

Tabla 8.-Fechas de análisis de endotoxinas

Condición	Cepa	Grupo Análisis	Cantidad de viales de inóculo	Muestra	Fecha de Análisis Endotoxinas
Sin Esterilización	CONTROL POSITIVO <i>E. coli</i>				2024-10-02
	CONTROL POSITIVO <i>S. enterica</i>				2024-10-02
	CONTROL NEGATIVO				2024-10-02
	<i>E. coli</i>	1	9 viales	EC1/198 – EC9/198	2024-10-02
		2	9 viales	EC10/198 – EC18/198	2024-10-02
		3	9 viales	EC19/198 – EC27/198	2024-10-03
		4	9 viales	EC28/198 – EC36/198	2024-10-03
		5	9 viales	EC37/198 – EC45/198	2024-10-04
		6	9 viales	EC46/198 – EC54/198	2024-10-04
		7	9 viales	EC55/198 – EC63/198	2024-10-07
		8	9 viales	EC64/198 – EC72/198	2024-10-07
		9	9 viales	EC73/198 – EC81/198	2024-10-09
		10	9 viales	EC82/198 – EC90/198	2024-10-09
		11	9 viales	EC91/198 – EC99/198	2024-10-10
	<i>S. enterica</i>	12	9 viales	SE1/198 – SE9/198	2024-10-10
		13	9 viales	SE10/198 – SE18/198	2024-10-11
		14	9 viales	SE19/198 – SE27/198	2024-10-11
		15	9 viales	SE28/198 – SE36/198	2024-10-14
		16	9 viales	SE37/198 – SE45/198	2024-10-14
		17	9 viales	SE46/198 – SE54/198	2024-10-15
		18	9 viales	SE55/198 – SE63/198	2024-10-15
		19	9 viales	SE64/198 – SE72/198	2024-10-16
20		9 viales	SE73/198 – SE81/198	2024-10-16	
21		9 viales	SE82/198 – SE90/198	2024-10-17	
22		9 viales	SE91/198 – SE99/198	2024-10-17	
Esterilizado 121 °C x 15 min	CONTROL POSITIVO <i>E. coli</i>				2024-10-18
	CONTROL POSITIVO <i>S. enterica</i>				2024-10-18
	CONTROL NEGATIVO				2024-10-18
	<i>E. coli</i>	23	9 viales	EC100/198 – EC108/198	2024-10-18
		24	9 viales	EC109/198 – EC117/198	2024-10-18
		25	9 viales	EC118/198 – EC126/198	2024-10-21
		26	9 viales	EC127/198 – EC135/198	2024-10-21
		27	9 viales	EC136/198 – EC144/198	2024-10-22
	<i>S. enterica</i>	28	9 viales	SE100/198 – SE108/198	2024-10-22
		29	9 viales	SE109/198 – SE117/198	2024-10-23
		30	9 viales	SE118/198 – SE126/198	2024-10-23
		31	9 viales	SE127/198 – SE135/198	2024-10-24
		32	9 viales	SE136/198 – SE144/198	2024-10-24
33		9 viales	SE145/198 – SE153/198	2024-10-25	
Esterilizado 134°C x 3 min	CONTROL POSITIVO <i>E. coli</i>				2024-10-25
	CONTROL POSITIVO <i>S. enterica</i>				2024-10-25
	CONTROL NEGATIVO				2024-10-25
	<i>E. coli</i>	34	9 viales	EC145/198 – EC153/198	2024-10-25
		35	9 viales	EC154/198 – EC162/198	2024-10-28
		36	9 viales	EC163/198 – EC171/198	2024-10-28
		37	9 viales	EC172/198 – EC180/198	2024-10-29
		38	9 viales	EC181/198 – EC189/198	2024-10-29
	<i>S. enterica</i>	39	9 viales	EC190/198 – EC198/198	2024-10-30
		40	9 viales	SE154/198 – SE162/198	2024-10-30
		41	9 viales	SE163/198 – SE171/198	2024-10-31
		42	9 viales	SE172/198 – SE180/198	2024-10-31
		43	9 viales	SE181/198 – SE189/198	2024-11-01
44		9 viales	SE190/198 – SE198/198	2024-11-01	

Leyenda: += Formación de coágulo
 -= No Formación de coágulo

Los resultados de análisis de endotoxinas fueron reportados en el formato MIC-RGT-039 v4 “Registro de prueba de endotoxinas bacterianas”. Laboratorio Microbiología -Teva Perú. Ver Anexo 5.

8.13 Análisis estadísticos:

Para el análisis estadístico se consideró un análisis de proporciones para 1 variable dicotómica.

- X= viales positivos a endotoxinas
- Y= 9 viales (total).

Porcentaje de positividad

El porcentaje de positividad en cada condición fue determinado dividiendo el número de viales positivos a la endotoxina sobre el número total de viales (9 viales), este valor fue expresado en porcentaje.

Las condiciones fueron las siguientes

Grupo A: Inóculo de *E. coli* sin esterilizar

Grupo B: Inóculo de *S. enterica* sin esterilizar

Grupo C: Inóculo de *E. coli* esterilizado a 121°C x 15 minutos

Grupo D: Inóculo de *S. enterica* esterilizado a 121°C x 15 minutos

Grupo E: Inóculo de *E. coli* esterilizado a 134°C x 3 minutos

Grupo F: Inóculo de *S. enterica* esterilizado a 134°C x 3 minutos

Las medias del porcentaje de positividad de cada condición fueron comparados usando el método de t student en el programa JMP versión 16 (nivel de significancia 0.05). Los resultados fueron reportados de acuerdo a la Tabla 9:

1. Promedio % de positividad entre cepas sin esterilización (A vs B)
2. Promedio % de positividad entre cepas con esterilización a 121°C (C vs D)
3. Promedio % de positividad entre cepas con esterilización a 134°C (E vs F)
4. Promedio % de positividad entre para *E.coli* entre 121°C y 134°C (C vs E)
5. Promedio % de positividad entre para *S. enterica* entre 121°C y 134°C (D vs F)

Tabla 9.-Reporte de resultados

Condición	Cepa	% de positivos por condición		% de positivos por cepa	% de positivos por grupo
Sin Esterilización	<i>E. coli</i>	Promedio (G)		Promedio (A)	(X1/9)*100
					(X2/9)*100
					(X3/9)*100
					(X4/9)*100
					(X5/9)*100
	<i>S. enterica</i>			Promedio (B)	(Y1/9)*100
					(Y2/9)*100
					(Y3/9)*100
					(Y4/9)*100
					(Y5/9)*100
					(Y6/9)*100
Esterilizado 121 °C x 15 min	<i>E. coli</i>	Promedio (J)		Promedio (C)	(E1/9)*100
					(E2/9)*100
					(E3/9)*100
					(E4/9)*100
					(E5/9)*100
	<i>S. enterica</i>			Promedio (D)	(ES1/9)*100
					(ES2/9)*100
					(ES3/9)*100
					(ES4/9)*100
					(ES5/9)*100
					(ES6/9)*100
Esterilizado 134°C x 3 min	<i>E. coli</i>	Promedio (I)		Promedio (E)	(D1/9)*100
					(D2/9)*100
					(D3/9)*100
					(D4/9)*100
					(D5/9)*100
	<i>S. enterica</i>			Promedio (F)	(F1/9)*100
					(F2/9)*100
					(F3/9)*100
					(F4/9)*100
					(F5/9)*100
					(F5/9)*100

8.14 Consideraciones éticas:

Este estudio no involucró a humanos o animales durante su ejecución, el proyecto obtuvo la aprobación del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código de inscripción 212248, Constancia N° CAR-DUARI-288-23).

8.15 Bioseguridad:

La ejecución de la presente investigación se desarrolló en el Laboratorio TEVA PERÚ el cual cuenta con el certificado de BPM/BPL (Buenas Prácticas de Manufactura/ Buenas Prácticas de Laboratorio) vigente emitido por DIGEMID (Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas), el laboratorio cuenta con un nivel de bioseguridad nivel 2, además de áreas clasificadas tipo D con HEPAs ductos, control de diferenciales de presión, control de temperatura y humedad, así como acceso restringido. De acuerdo ANEXO I: Clasificación de microorganismos según Grupos de Riesgo (OMS, Manual de Bioseguridad en Laboratorios, 3era Edición, 2005), los microorganismos usados *E. coli* ATCC8739 y *S. enterica* ATCC 14028 pertenecen al grupo de Riesgo II, el manejo de las cepas se realizó dentro de una sala clase D con el uso de la cabina de bioseguridad marca Labconco “Purifer Logic” SN 101234725 B. Para el ingreso al área de análisis se contó con los siguientes EPP: Guantes de látex, mandil blanco desechable, mascarilla, toca y lentes de seguridad, para la descontaminación de mesas, equipos, vidrios, manos, superficies de acero inoxidable se usó alcohol etílico al 70% y para el caso de techos paredes, pisos, puertas, etc, se usó cloruro de benzalconio al 5%. La destrucción de las muestras usadas fue mediante una doble esterilización en autoclave bajo la condición de 121°C x 45 minutos, para la disposición de los estos residuos peligrosos, se usaron dobles bolsas rojas selladas de acuerdo a la segregación de los residuos por colores. Una vez

segregados fueron trasladados a zona de acopio para que la empresa especializada KANNAY S.A.C. el cual procedió con su tratamiento de eliminación.

9.- RESULTADOS

9.1 Determinación de la concentración bacteriana de los inóculos:

Los resultados de la transmitancia de 198 inóculos *E. coli* preparados entre 2024-09-09 al 2024-09-23 son mostrados en la Figura 9, en todos los casos se observan valores de transmitancia entre 58% a 62%, este porcentaje representa la cantidad de luz que atravesó la preparación del inóculo a 600nm en el espectrofotómetro y es equivalente a la turbidez producida por una concentración bacteriana de *E. coli* a 3.0×10^8 ufc/mL, en este sentido todos los inóculos de *E.coli* presentaron concentraciones equivalentes a 3.0×10^8 ufc/mL.

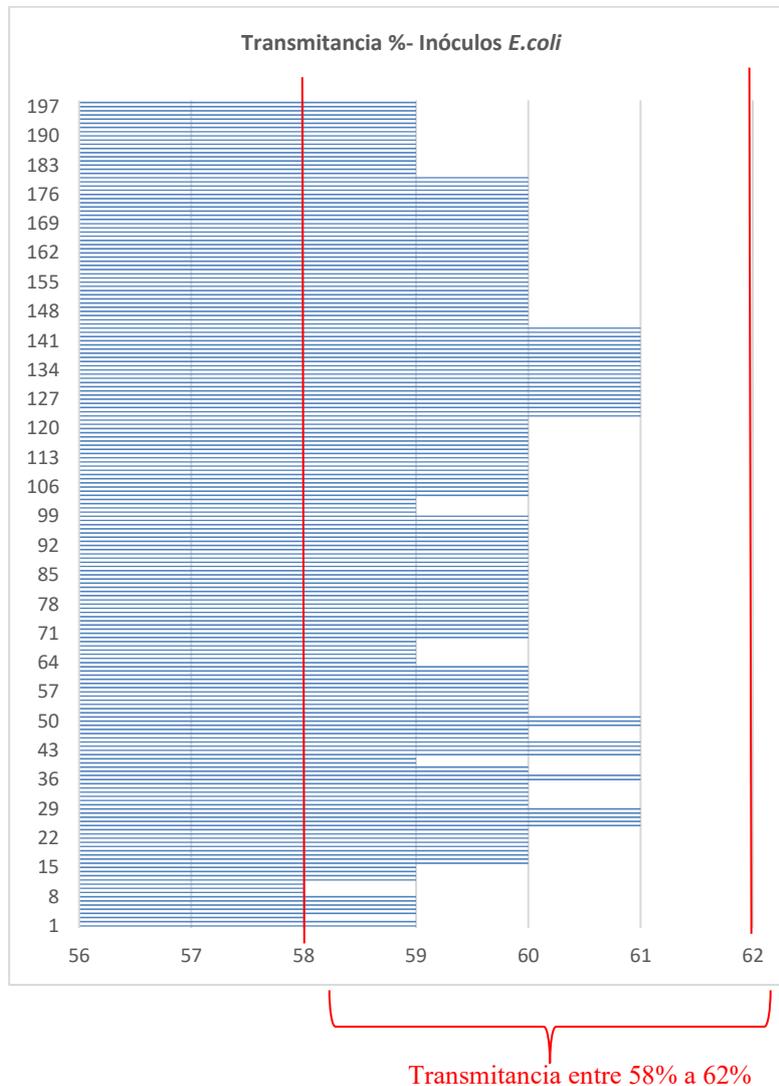


Figura 9.-Transmitancia de inóculos *E. coli*

Los resultados de la transmitancia de 198 inóculos *S. enterica*, preparados entre 2024-09-09 al 2024-09-23 son mostrados en la Figura 10, en todos los casos se observan valores de transmitancia entre 58% a 62%, este porcentaje representa la cantidad de luz que atravesó la preparación del inóculo a 600nm en el espectrofotómetro y es equivalente a la turbidez producida por una concentración bacteriana de *S. enterica* a 1.6×10^8 ufc/mL, en este sentido todos los inóculos de *S. enterica* presentaron concentraciones equivalentes a 1.6×10^8 ufc/mL.

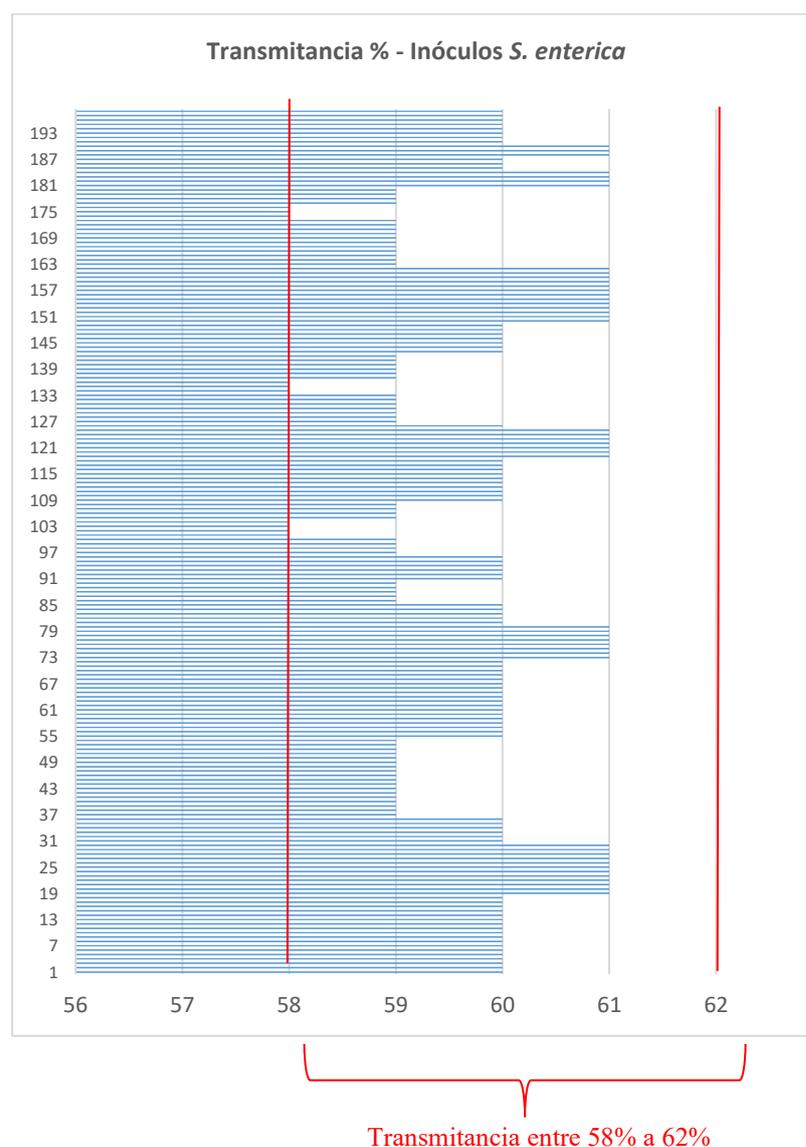


Figura 10.-Transmitancia inóculos *S. enterica*

9.2 Prueba de distribución de calor:

Los resultados de distribución térmica de los 3 ciclos de esterilización a 121°C x 15 minutos y 134°C x 3 minutos se muestran en la Tabla 10 y 11 respectivamente:

Tabla 10.-Resultados de distribución de calor (121°C)

DATOS	Temperatura: 121°C Tiempo: 15 min		
	1° Ciclo	2° Ciclo	3° Ciclo
Sensor 1	121,93	121,68	121,59
Sensor 2	121,79	121,56	121,47
Sensor 3	121,87	121,64	121,55
Sensor 4	121,92	121,69	121,61
Sensor 5	121,85	121,61	121,52
Sensor 6	121,95	121,70	121,61
Sensor 7	121,82	121,58	121,49
Sensor 8	121,92	121,68	121,60
Sensor 9	121,97	121,71	121,63
Temperatura promedio.	121,89°C	121,65°C	121,56°C
Máxima desviación	0,97°C	0,71°C	0,63°C
Sensor registrador	121°C	121°C	121°C

Tabla 11.-Resultados de distribución de calor (134°C)

DATOS	Temperatura: 134°C Tiempo: 3 min		
	1° Ciclo	2° Ciclo	3° Ciclo
Sensor 1	133,96	133,62	133,40
Sensor 2	133,89	133,57	133,35
Sensor 3	133,89	133,59	133,36
Sensor 4	133,85	133,57	133,34
Sensor 5	133,82	133,57	133,34
Sensor 6	133,79	133,56	133,33
Sensor 7	133,78	133,56	133,33
Sensor 8	133,82	133,56	133,34
Sensor 9	133,88	133,61	133,39
Temperatura promedio.	133,85°C	133,58°C	133,35°C
Máxima desviación	0,96°C	0,62°C	0,40°C
Sensor registrador	134°C	134°C	134°C

En base a los resultados obtenidos se confirmó que el calor se distribuyó de manera homogénea dentro de la cámara de la autoclave para las condiciones de 121°C y 134°C (promedio dentro de 121°C +/-1°C y 134°C +/-1°C), por lo tanto, el sistema se encontró APTO para proseguir con las pruebas con carga hospitalaria para la detección de endotoxinas liberadas

9.3 Temperatura y tiempo en cada proceso de esterilización:

Los resultados de temperatura y tiempo de cada proceso de esterilización se indican en la Tabla 12.

Tabla 12.-Resultados de tiempo y temperatura de esterilización

Condición	Cepa	Cantidad de Ciclos	Nº Ciclo	Tº Base	Tº Mínima	Tº Máxima	Tiempo de Exposición
Esterilizado 121 °C x 15 min	<i>E. coli</i>	5 ciclos por 9 viales	1	121°C	121.16°C	121.30°C	15 minutos
			2	121°C	121.08°C	121.22°C	15 minutos
			3	121°C	121.04°C	121.18°C	15 minutos
			4	121°C	121.11°C	121.25°C	15 minutos
			5	121°C	121.38°C	121.53°C	15 minutos
	<i>S. enterica</i>	6 ciclos por 9 viales	1	121°C	121.10°C	121.22°C	15 minutos
			2	121°C	121.09°C	121.23°C	15 minutos
			3	121°C	121.19°C	121.34°C	15 minutos
			4	121°C	121.11°C	121.24°C	15 minutos
			5	121°C	121.06°C	121.20°C	15 minutos
			6	121°C	121.10°C	121.23°C	15 minutos
Esterilizado 134°C x 3 min	<i>E. coli</i>	6 ciclos por 9 viales	1	134°C	133.44°C	133.60°C	3 minutos
			2	134°C	133.00°C	133.04°C	3 minutos
			3	134°C	133.27°C	133.29°C	3 minutos
			4	134°C	133.42°C	133.45°C	3 minutos
			5	134°C	133.26°C	133.29°C	3 minutos
			6	134°C	133.23°C	133.25°C	3 minutos
	<i>S. enterica</i>	5 ciclos por 9 viales	1	134°C	133.24°C	133.26°C	3 minutos
			2	134°C	133.41°C	133.43°C	3 minutos
			3	134°C	133.19°C	133.23°C	3 minutos
			4	134°C	133.19°C	133.21°C	3 minutos
			5	134°C	133.21°C	133.24°C	3 minutos

En todos los casos la temperatura alcanzada para cada ciclo de esterilización se mantuvo homogénea y fue la necesaria para lograr la inactivación y destrucción bacteriana.

9.4 Análisis de endotoxinas:

El porcentaje de positividad de la presencia de endotoxinas por grupos se indican en la Tabla 13.

Tabla 13.- Porcentaje de positividad de presencia de endotoxinas por grupos

Grupo Análisis	Condición	Cepa	% de positivos por condición		% de positivos por cepa	% de positivos por grupo		
1	Sin Esterilización	<i>E. coli</i>	0%		0% (A)	0%	9 (-); 0 (+)	
2						0%	9 (-); 0 (+)	
3						0%	9 (-); 0 (+)	
4						0%	9 (-); 0 (+)	
5						0%	9 (-); 0 (+)	
6						0%	9 (-); 0 (+)	
7						0%	9 (-); 0 (+)	
8						0%	9 (-); 0 (+)	
9						0%	9 (-); 0 (+)	
10						0%	9 (-); 0 (+)	
11						0%	9 (-); 0 (+)	
12		<i>S. enterica</i>	0%	(G)		0% (B)	0%	9 (-); 0 (+)
13							0%	9 (-); 0 (+)
14							0%	9 (-); 0 (+)
15							0%	9 (-); 0 (+)
16							0%	9 (-); 0 (+)
17							0%	9 (-); 0 (+)
18							0%	9 (-); 0 (+)
19							0%	9 (-); 0 (+)
20							0%	9 (-); 0 (+)
21							0%	9 (-); 0 (+)
22							0%	9 (-); 0 (+)
23	Esterilizado 121 °C x 15 min	<i>E. coli</i>	46.8%	27.8%	33.3% (C)	55.6%	4 (-); 5 (+)	
24						44.4%	5 (-); 4 (+)	
25						11.1%	8 (-); 1 (+)	
26						44.4%	5 (-); 4 (+)	
27						11.1%	8 (-); 1 (+)	

28		<i>S. enterica</i>			22.2% (D)	55.6%	4 (-); 5 (+)
29						22.2%	7 (-); 2 (+)
30						11.1%	8 (-); 1 (+)
31						11.1%	8 (-); 1 (+)
32						22.2%	7 (-); 2 (+)
33						11.1%	8 (-); 1 (+)
34	Esterilizado 134°C x 3 min	<i>E. coli</i>		65.7% (I)	75.9% (E)	66.7%	3 (-); 6 (+)
35						88.9%	1 (-); 8 (+)
36						77.8%	2 (-); 7 (+)
37						66.7%	3 (-); 6 (+)
38						77.8%	2 (-); 7 (+)
39		77.8%			2 (-); 7 (+)		
40		<i>S. enterica</i>			55.6% (F)	55.6%	4 (-); 5 (+)
41						33.3%	6 (-); 3 (+)
42						44.4%	5 (-); 4 (+)
43						66.7%	3 (-); 6 (+)
44	77.8%		2 (-); 7 (+)				

Leyenda: += Presencia de endotoxinas
 -= Ausencia de endotoxinas

La trazabilidad de los resultados del porcentaje de positividad de presencia de endotoxinas por grupos se indica en el Anexo 5.

Los resultados de detección de endotoxinas se indican en la Tabla 14.

Tabla 14.-Resultados de detección de endotoxinas

Condición	Cepa	Detección de Endotoxina Positivos/Total (Sensibilidad)
Sin Esterilización	<i>E. coli</i>	0%
	<i>S. enterica</i>	0%
Esterilizado 121 °C x 15 min	<i>E. coli</i>	15/45 (33.3%)
	<i>S. enterica</i>	12/54 (22.2%)
Esterilizado 134°C x 3 min	<i>E. coli</i>	34/54 (75.9%)
	<i>S. enterica</i>	25/45 (55.6%)

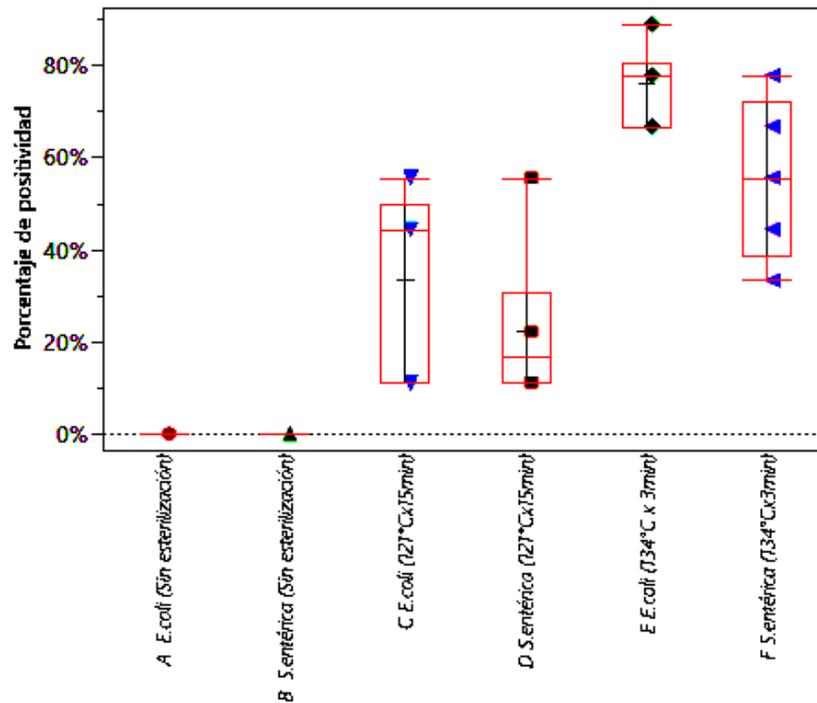


Figura 11.-Porcentaje de positividad por condición

9.5 Comparación de los % de positividad entre grupos

Promedio % de positividad entre cepas sin esterilización (A vs B). No hay diferencia entre los grupos A y B, por lo tanto no existe % porcentaje de positividad en los grupos no sometidos a esterilización.

Promedio % de positividad entre cepas con esterilización a 121°C (C vs D). No hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos C y D (El valor $p = 0.3694$ (Prob $> |t|$) es mayor a 0.05).

Promedio % de positividad entre cepas con esterilización a 134°C (E vs F) No hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos E y F (El valor $p = 0.0589$ (Prob $> |t|$) es mayor a 0.05).

Promedio % de positividad entre para *E.coli* entre 121°C y 134°C (C vs E)

El porcentaje de liberación de endotoxinas de *E.coli* es mayor a 134°C (valor p = 0.0074 (Prob < |t|) es menor a 0.05).

Promedio % de positividad entre para *S. enterica* entre 121°C y 134°C (D vs F)

La diferencia estadística entre los grupos D y F es significativa (valor p = 0.0123 (Prob < |t|) es menor a 0.05). Por lo tanto el porcentaje de liberación de endotoxinas para *S. enterica* entre 121°C y 134°C tiene diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 15.-Resultados comparativos del promedio de positividad

Condición 1	Condición 2	p-value	Resultado
A (<i>E.coli</i> sin esterilización)	B (<i>S.enterica</i> sin esterilización)	-	Sin variación
C (<i>E.coli</i> a 121°Cx 15min)	D (<i>S.enterica</i> a 121°Cx 15min)	0.3694	Sin deferencias estadísticamente significativas
E (<i>E.coli</i> a 134°Cx 3min)	F (<i>S.enterica</i> a 134°Cx 3min)	0.0589	Sin deferencias estadísticamente significativas
C (<i>E.coli</i> a 121°Cx 15min)	E (<i>E.coli</i> a 134°Cx 3min)	0.0074	El porcentaje de positividad de endotoxinas de <i>E.coli</i> es mayor a 134°C
D (<i>S.enterica</i> a 121°Cx 15min)	F (<i>S.enterica</i> a 134°Cx 3min)	0.0123	El porcentaje de positividad de endotoxinas de <i>S. enterica</i> es mayor a 134°C

10.-DISCUSIÓN

Todos los inóculos preparados de *E.coli* y *S. enterica* evidenciaron valores de transmitancia entre 58%-62%, correspondientes a las concentraciones estandarizadas determinadas, así también las pruebas de distribución de calor en la autoclave fue conforme con variaciones de temperatura menores a 1°C, los resultados para la detección de la liberación de endotoxinas mostraron que en todos los inóculos *E.coli* y *S. enterica* sometidos a procesos de esterilización ya sea a 121°C y 134°C se detectó resultados positivos para la liberación de endotoxinas con porcentajes de positividad que varían entre el 11.1% hasta 88.9%, respectivamente; aumentando el porcentaje de positividad de la liberación de endotoxinas en función de la temperatura esterilización y sin impacto por el tipo de bacteria Gram-negativa sometida a esterilización.

Se consideró la elección de las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* como parte del estudio debido a que al ser más ubicuas en el ambiente hospitalario (apropiadamente el 35% microorganismos aislados en pacientes hospitalizados) (25) tienen una mayor probabilidad de formar parte del bioburden de los materiales hospitalarios y por ende mayor probabilidad de liberación de endotoxinas tras la esterilización, si bien es cierto que no se cuenta con información sobre las concentraciones aproximadas del bioburden de estas bacterias en materiales hospitalarios sin esterilización incluso sucios, se ha considerado concentraciones peores casos reportados en asilamientos de bioburden de materiales sucios sin esterilización en la industria farmacéutica, dichas concentración fueron validadas por el laboratorio de apoyo ejecutante. Ver Anexo 1.

La inducción de la liberación de endotoxinas por autoclavado se dio bajo mismas condiciones de tipo de material hospitalario, disposición espacial de muestras y concentración de inóculos variando únicamente el tiempo y temperatura de cada

condición evaluada, si bien es cierto que los inóculos estandarizados fueron dispuestos dentro de los materiales hospitalarios con diferente composición y grado de porosidad, esta variación no afectó los resultados obtenidos debido a que previamente se ha demostrado mediante la prueba de distribución de calor que todas las zonas de la autoclave mantienen una temperatura con una variación no mayor 1°C garantizando que los inóculos fueron afectados bajo la misma condición térmica.

Los resultados obtenidos para el análisis de endotoxinas de los inóculos de *E. coli* ATCC8739 y *S. enterica* ATCC 14028 antes de ser sometidas a un proceso de esterilización, no presentan variación ni diferencia estadísticamente significativa, en todos los casos no se detecta la liberación de endotoxinas al medio, confirmando que la membrana externa donde se encuentra anclada la endotoxina no ha sufrido lisis o daño alguno, este resultado era el esperado debido a que es necesario el daño celular para la liberación de endotoxinas, en este caso los inóculos no fueron sometidos a ningún proceso térmico previo al análisis.

Para el caso de los inóculos *E. coli* y *S. enterica* sometidos a procesos de esterilización ya sea a 121°C y 134°C en todos los casos se han evidenciado resultados positivos para la detección de la liberación de endotoxinas con porcentajes de positividad que varían entre el 11.1% hasta 88.9% confirmando lo indicado por estudio de Mason Schneier 2020 (3), en la cual reportan que tras la muerte de una bacteria Gram-negativa, durante la producción de productos biofarmacéuticos recombinantes, se liberan endotoxinas en el lisado. De acuerdo a nuestros resultados se evidenció un mayor porcentaje de positividad de liberación de endotoxinas en función al aumento de la temperatura de esterilización, es así que los inóculos sometidos a 121°C obtuvieron un % de positividad de liberación de endotoxinas de 27.8%, mientras que los inóculos sometidos a 134°C de un 65.7%, representando un aumento de casi 40% en el % positividad de liberación de endotoxinas

a 134°C. De la misma manera al realizar la discriminación por el tipo de inóculo podemos ver que para el caso de *E. coli* se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre el % de positividad de liberación de endotoxinas a 121°C y 134°C (valor $p = 0.0074$ (Prob < |t|) es menor a 0.05), así también para el caso de *S. enterica* se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre el % de positividad liberación de endotoxinas a 121°C y 134°C (valor $p = 0.0123$ (Prob < |t|) es menor a 0.05). Estos resultados nos demuestran que una mayor temperatura produce un mayor daño en la estructura celular generando un mayor porcentaje de lisis y por ende mayor liberación de endotoxinas al medio. Esta relación entre una mayor ruptura celular y una mayor liberación de endotoxinas fue reportada en el en el estudio de Pérولا O. titulado “Lipopolysaccharide, LPS removal, Depyrogenation” 2010 (4).

En el estudio comparativo entre el porcentaje de positividad liberación de endotoxinas bajo la misma condición térmica, podemos observar que, para el caso de 121°C, no existen diferencias estadísticamente significativas del % de positividad liberación de endotoxinas entre los inóculos de *S. enterica* y *E. coli* (valor $p = 0.3694$ (Prob > |t|) es mayor a 0.05), de la misma manera se evidencia para el caso de 134°C, tampoco existen diferencias estadísticamente significativas del % de positividad liberación de endotoxinas entre los inóculos de *S. enterica* y *E. coli* (valor $p = 0.0589$ (Prob > |t|) es mayor a 0.05). De acuerdo a estos resultados podemos indicar que el tipo de bacteria Gram-negativa no tiene mayor impacto sobre el % de positividad liberación de endotoxina, demostrando que en ambos grupos bajo la misma condición térmica el % de positividad liberación no presenta diferencias estadísticamente significativas.

En base a los resultados podemos indicar que los procesos de esterilización llevados a 121°C y 134°C (especialmente a 134°C) conllevan a una fuente de introducción de endotoxinas en materiales médicos, este hecho confirma lo indicado por el estudio de

Hongli Li 2016 (6), en la cual concluye que en el entorno del laboratorio, diferentes fuentes pueden introducir la contaminación por endotoxinas en los productos médicos, incluidos el material de vidrio. Cabe señalar que el % de positividad de liberación de endotoxinas aumenta en función de la temperatura de esterilización y no presenta diferencias estadísticamente significativas en función del tipo bacteria Gram-negativa presente en el material.

11.-CONCLUSIONES

Todos los inóculos preparados de *E.coli* y *S. enterica* presentaron concentraciones bacterianas equivalentes a 3.0×10^8 ufc/mL y 1.6×10^8 ufc/mL respectivamente.

La prueba de distribución de calor inicial demostró que la temperatura se distribuyó de manera homogénea dentro de la cámara de la autoclave para las condiciones de 121°C y 134°C (promedio dentro de 121°C +/-1°C y 134°C +/-1°C). Así mismo para cada ciclo de esterilización la temperatura de esterilización se mantuvo uniforme.

No se detectó resultados positivos para la liberación de endotoxinas en inóculos estandarizados *E.coli* y *S. enterica* que no fueron sometidos a procesos de esterilización.

En los procesos de autoclavado bajo las condiciones recomendadas por el Ministerio de Salud-Perú (121°C x 15 minutos y 134°C x 3 minutos) se detectó resultados positivos para la liberación de endotoxinas en los inóculos estandarizados dispuestos dentro de materiales hospitalarios.

En todos los casos para los inóculos *E.coli* y *S. enterica* sometidos a procesos de esterilización ya sea a 121°C y 134°C se detectó resultados positivos para la liberación de endotoxinas con porcentajes de positividad que varían entre el 11.1% hasta 88.9%, respectivamente; aumentando el porcentaje de positividad de la liberación de endotoxinas en función de la temperatura esterilización y sin impacto por el tipo de bacteria Gram-negativa sometida a esterilización.

12.- RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar el estudio realizado con el uso de cepas nativas de los hospitales y poder evaluar también la inducción de liberación de endotoxinas con el uso de estas cepas, así también la búsqueda de nuevas tecnologías para la detección de endotoxinas como parte del control de calidad de la esterilización.

Al MINSA se recomienda la actualización del documento técnico Manual de Desinfección y Esterilización -2021” – RD_183_2021_D_HNDM. 2021. Ministerio de Salud Perú, detallando las medidas de contención frente a la contaminación de endotoxinas en los procesos de esterilización, se debe considerar una limpieza química validada antes de los procesos de esterilización. Así como una re-evaluación de la condición de esterilización de 134°C la cual presenta un alto % de liberación de endotoxinas al medio.

13.- BIBLIOGRAFÍA

- 1) Documento Técnico “Manual de Desinfección y Esterilización -2021” – RD_183_2021_D_HNDM. 2021. Ministerio de Salud Perú.
- 2) Dept. Of Health, Education, and Welfare Public Health Service Food and Drug Administration, EE.UU, 2014. Inspection Technical Guides/ Bacterial Endotoxins/Pyrogens
<https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/bacterial-endotoxinspyrogens>
- 3) Schneier M., “Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification”, Biotechnol Bioeng Epub, 2020, DOI: 10.1002/bit.27362.
- 4) Pérola O, “Lipopolysaccharide, LPS removal, Depyrogenation”, Wiley Online Library , 2010, <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib388>.
- 5) Hongli Li, “Rapid detection of bacterial endotoxins in ophthalmic viscosurgical device materials by direct analysis in real time mass spectrometry”, Epub 2016, DOI: 10.1016/j.aca.2016.09.030
- 6) Bononi Ll., “Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharide Retention by a Positively Charged New-Generation Filter”, Appl Environ Microbiol, 2008 DOI: 10.1128/AEM.00552-08
- 7) Lundin J., “Endotoxin and Cancer”, Environ Health Perspect, 2009, DOI: 10.1289/ehp.0800439
- 8) Surya B., “Endotoxins Affecting Human Health during Agricultural Practices: An Overview”, India, 2022, AppliedChem 2023, 3(1), 11-31 <https://DOI.org/10.3390/appliedchem3010002>
- 9) Abd El Rahman A. El Garawany, “Effects Of Bacterial Endotoxin On Some Metabolites And Enzymes In Rat Serum,L, Medical Journal of Islamic, 2005, World Academy of Sciences 15:2, 65-72.
- 10) FDA guidance "Process Validation: General Principles and Practices". January 2011.
- 11) FDA Guidance "Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing", September 2004.
- 12) Parenteral Drug Association Technical Report No. 1, "Validation of Moist Heat Sterilization Processes: Cycle Design, Development, Qualification and

Ongoing Control".

- 13) Parenteral Drug Association Technical Report No. 3, "Validation of Dry Heat Processes used for Sterilization and Depyrogenation", Draft 2009 edition.
- 14) EMA Guideline on the Sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container. EMA/CHMP/CVMP/QWP/850374/2015.
- 15) I.S. EN ISO 20857 Sterilization of Health Care Products - dry Heat - Requirements for the Development, Validation and Routine Control of a Sterilization Process for Medical Devices;
- 16) I.S. EN ISO 11135 Sterilization of Health-care Products - Ethylene Oxide - Requirements for the Development, Validation and Routine Control of a Sterilization Process for Medical Devices; I.S. EN ISO 17665-1 Sterilization of Health Care Products - Moist Heat - Part 1: Requirements for the Development, Validation and Routine
- 17) Control of a Sterilization Process for Medical Devices, and, ISO/TS 17665-2 Sterilization of health care products -- Moist heat -- Part 2: Guidance on the application of ISO 17665-1;
- 18) Camargo TC, Graziano KU, Ameida AGCS, Suzuki K, Silva CB, Pinto FMG. Microbiological evaluation of the steam sterilization of assembled laparoscopic instruments. Rev. Latino-Am. Enfermagem. 2016; 24:e2830. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/151>
- 19) USP 44 Capítulo General 85 BACTERIAL ENDOTOXINS TEST DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M98803_01_01
- 20) USP 44 Capítulo General 62 MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS: TESTS FOR SPECIFIED MICROORGANISMS DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M98802_01_01
- 21) USP 44 Capítulo General 61 MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS: MICROBIAL ENUMERATION TESTS DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M98800_01_01
- 22) Jakson, S. Consecuencias de la contaminación simultánea con micotoxinas y endotoxinas. Molendotech Reino Unido. <https://mycotoxinsite.com/endotoxinas-piensos-relacion-micotoxinas/>

- 23) PC-018 “Procedimiento Para La Calibración o Caracterización De Medios Termostáticos con aire como medio termostático” de INDECOPI 2009- LIMA PERÚ.
- 24) Ministerio de Salud, Oficina de Epidemiología y Salud Ambiental, Boletín Epidemiológico Hospital Dos de Mayo Lima Perú (junio 2018). Código OESA-HNDM-B:06, Año 7 Volumen 3.
- 25) Ministerio de Salud, Oficina de Epidemiología y Salud Ambiental, Mapa Microbiológico General del Hospital Nacional Dos de Mayo, Año 2023
- 26) Tessarolo F, “ Efficiency in endotoxin removal by a reprocessing protocol for electrophysiology catheters based on hydrogen peroxide plasma sterilization”, 2006, International Journal of Hygiene and Enviroment Health, pages 557-565 <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.05.001>
- 27) WHO (World Health Organization), boletín informativo, E.coli (2018). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli> (ultimo acceso 2025-05-19)
- 28) WHO (World Health Organization), boletín informativo, Salmonella (2018). [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)) (ultimo acceso 2025-05-19)

ANEXOS

Anexo 1

Reporte de validación del método microbiológico para el procedimiento de estandarización de inóculo RV-(MIC-INS-012-02)-00

	REPORTE DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA EL PROCEDIMIENTO DE ESTANDARIZACIÓN DE INOCULO	RV-(MIC-INS-012-02)-00
---	--	------------------------

9 DICTAMEN.

De acuerdo con los resultados obtenidos confrontados con los criterios de aceptación establecidos en el protocolo de validación: PV-(MIC-INS-012)-00, los miembros del Equipo de Validaciones dictamina que:

El concentraciones inferidas para la estandarización de inóculo que se detallan en el siguiente cuadro, cumple los criterios y encuentran validadas.

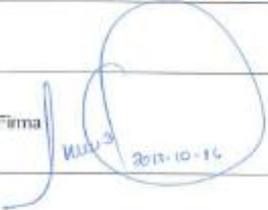
Microorganismo de prueba	T (%)	Descripción (ufc/mL)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9633	<58-62>	3.0×10^7 ;
<i>Kocuria rhizophila</i> ATCC 9341	<58-62>	1.0×10^7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<58-62>	1.4×10^8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<58-62>	4.4×10^7
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<58-62>	3.0×10^8
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	<58-62>	1.6×10^8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<58-62>	2.5×10^7
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	<21-24>	5.0×10^5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<10-14>	2.3×10^7

Elaborado por:

Manuel Varona Analista de Control de Calidad	Firma  2017-10-14
--	--

Revisado por:

José La Torre Sistemas de Calidad & Cumplimiento	Firma  2017-10-27
--	--

Augusto Silupú Supervisión - Validaciones de Métodos Analíticos	Firma  2017-10-16
--	---

Aprobado por:

María Llamoca Jefe de Control de Calidad	Firma  2017-10-16
--	--

Rubén Villena Gerencia de Control de Calidad	Firma  2017-10-17
--	--

Jose Chanca Gerencia de Aseguramiento de Calidad	Firma  2017-10-25
--	---

Liliana Pérez Dirección Técnica	Firma  2017-11-08
---	--

Anexo 3

Reporte de Esterilización equipo KAYE VALIDATOR NS: 1408016

121°C x 15 minutos

Vessel ID -		Group 1 - G1 - Sensor Inputs											
Load Description -		SOP/Protocol Number -											
Comment -													
26-sep-2024													
		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12
		T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	T11	T12
10:19:02	*** Start Qualification *** Manual	NICOLAS INGA											
		100.42 °C	100.37 °C	100.43 °C	100.49 °C	100.42 °C	100.52 °C	100.39 °C	100.50 °C	100.43 °C	100.41 °C	100.47 °C	100.42 °C
10:20:00		100.35 °C	100.29 °C	100.37 °C	100.43 °C	100.33 °C	100.46 °C	100.37 °C	100.44 °C	100.38 °C	100.37 °C	100.44 °C	100.35 °C
10:21:00		106.00 °C	105.29 °C	106.16 °C	105.78 °C	105.76 °C	106.05 °C	106.09 °C	105.59 °C	106.23 °C	106.31 °C	106.14 °C	105.45 °C
10:22:00		112.98 °C	112.30 °C	113.16 °C	112.81 °C	112.80 °C	113.07 °C	113.11 °C	112.60 °C	113.27 °C	113.33 °C	113.13 °C	112.47 °C
10:23:00		118.93 °C	118.35 °C	119.09 °C	118.81 °C	118.79 °C	119.01 °C	119.05 °C	118.63 °C	119.17 °C	119.23 °C	119.07 °C	118.51 °C
10:24:00		121.75 °C	121.55 °C	121.77 °C	121.76 °C	121.72 °C	121.81 °C	121.72 °C	121.71 °C	121.84 °C	121.81 °C	121.80 °C	121.60 °C
10:24:14	*** Start Exposure *** Manual	NICOLAS INGA											
	Start Interval: Exp Start												
		121.86 °C	121.70 °C	121.85 °C	121.88 °C	121.81 °C	121.91 °C	121.80 °C	121.84 °C	121.90 °C	121.87 °C	121.88 °C	121.75 °C
10:25:00		121.87 °C	121.78 °C	121.81 °C	121.90 °C	121.81 °C	121.90 °C	121.77 °C	121.89 °C	121.84 °C	121.80 °C	121.87 °C	121.80 °C
10:26:00		121.64 °C	121.59 °C	121.62 °C	121.72 °C	121.63 °C	121.73 °C	121.60 °C	121.74 °C	121.67 °C	121.63 °C	121.71 °C	121.65 °C
10:27:00		121.50 °C	121.44 °C	121.49 °C	121.58 °C	121.49 °C	121.58 °C	121.46 °C	121.59 °C	121.52 °C	121.49 °C	121.56 °C	121.51 °C
10:28:00		121.39 °C	121.33 °C	121.37 °C	121.46 °C	121.37 °C	121.47 °C	121.34 °C	121.48 °C	121.41 °C	121.38 °C	121.44 °C	121.39 °C
10:29:00		121.37 °C	121.26 °C	121.30 °C	121.39 °C	121.29 °C	121.39 °C	121.26 °C	121.39 °C	121.33 °C	121.29 °C	121.36 °C	121.31 °C
10:30:00		121.21 °C	121.16 °C	121.21 °C	121.29 °C	121.21 °C	121.31 °C	121.17 °C	121.30 °C	121.24 °C	121.21 °C	121.29 °C	121.22 °C
10:31:00		121.15 °C	121.09 °C	121.14 °C	121.23 °C	121.15 °C	121.23 °C	121.12 °C	121.24 °C	121.17 °C	121.14 °C	121.22 °C	121.16 °C
10:32:00		121.10 °C	121.05 °C	121.10 °C	121.18 °C	121.09 °C	121.19 °C	121.06 °C	121.18 °C	121.13 °C	121.10 °C	121.17 °C	121.11 °C
10:33:00		121.13 °C	121.02 °C	121.06 °C	121.15 °C	121.05 °C	121.15 °C	121.02 °C	121.15 °C	121.10 °C	121.06 °C	121.13 °C	121.07 °C
10:34:00		121.01 °C	120.95 °C	121.01 °C	121.10 °C	121.01 °C	121.11 °C	120.98 °C	121.10 °C	121.05 °C	121.02 °C	121.08 °C	121.02 °C
10:35:00		120.99 °C	120.93 °C	120.98 °C	121.07 °C	120.97 °C	121.08 °C	120.95 °C	121.07 °C	121.01 °C	120.99 °C	121.05 °C	120.99 °C
10:36:00		120.96 °C	120.91 °C	120.95 °C	121.04 °C	120.95 °C	121.05 °C	120.92 °C	121.05 °C	121.00 °C	120.96 °C	121.04 °C	120.97 °C
10:37:00		121.01 °C	120.91 °C	120.95 °C	121.03 °C	120.93 °C	121.03 °C	120.91 °C	121.04 °C	120.98 °C	120.94 °C	121.01 °C	120.95 °C
10:38:00		120.93 °C	120.87 °C	120.92 °C	121.01 °C	120.92 °C	121.01 °C	120.89 °C	121.01 °C	120.95 °C	120.93 °C	120.99 °C	120.93 °C
10:39:00		120.93 °C	120.85 °C	120.91 °C	120.99 °C	120.90 °C	121.00 °C	120.87 °C	120.99 °C	120.94 °C	120.92 °C	120.99 °C	120.92 °C
10:39:14	*** End Exposure *** Manual	NICOLAS INGA											
	Stop Interval: Exp End												
		120.93 °C	120.85 °C	120.90 °C	120.99 °C	120.90 °C	121.00 °C	120.87 °C	120.99 °C	120.96 °C	120.92 °C	120.98 °C	120.92 °C
10:40:00		120.82 °C	120.77 °C	120.78 °C	120.85 °C	120.81 °C	120.86 °C	120.66 °C	120.87 °C	120.79 °C	120.74 °C	120.78 °C	120.80 °C
10:41:00		110.99 °C	111.91 °C	110.57 °C	111.37 °C	111.20 °C	110.98 °C	110.57 °C	111.72 °C	110.52 °C	110.30 °C	110.73 °C	111.70 °C
10:42:00		100.75 °C	101.42 °C	100.60 °C	101.16 °C	100.92 °C	100.90 °C	100.70 °C	101.44 °C	100.51 °C	100.42 °C	100.87 °C	101.43 °C

134°C x 3 minutos

Vessel ID -		Group 1 - sim 1 - Sensor Inputs											
Load Description -		SOP/Protocol Number -											
Comment -													
01-oct-2024													
		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12
		K01	K02	K03	K04	K05	K06	K07	K08	K09	K10	K11	K12
09:25:18	*** Start Qualification *** Manual	NICOLAS INGA											
		93.58 °C	93.62 °C	93.48 °C	93.50 °C	93.45 °C	93.42 °C	93.58 °C	93.73 °C	93.55 °C	93.61 °C	93.53 °C	93.73 °C
09:26:00		91.83 °C	91.82 °C	91.68 °C	91.66 °C	91.60 °C	91.59 °C	91.75 °C	91.90 °C	91.80 °C	91.88 °C	91.73 °C	91.95 °C
09:27:00		107.57 °C	107.08 °C	107.70 °C	106.94 °C	107.42 °C	107.20 °C	105.90 °C	105.08 °C	107.29 °C	106.94 °C	107.57 °C	106.23 °C
09:28:00		130.71 °C	130.28 °C	131.42 °C	131.21 °C	131.28 °C	130.94 °C	129.94 °C	128.83 °C	130.15 °C	129.76 °C	131.17 °C	129.74 °C
09:29:00		134.09 °C	133.94 °C	134.17 °C	134.22 °C	134.19 °C	133.99 °C	134.04 °C	133.97 °C	133.90 °C	133.87 °C	134.16 °C	133.98 °C
09:30:00		133.04 °C	132.97 °C	132.94 °C	132.89 °C	132.89 °C	132.82 °C	132.88 °C	132.98 °C	132.98 °C	132.99 °C	132.95 °C	132.98 °C
09:30:08	*** Start Exposure *** Manual	NICOLAS INGA											
	Start Interval: Exp Start												
		133.02 °C	132.97 °C	132.96 °C	132.90 °C	132.91 °C	132.85 °C	132.88 °C	132.96 °C	132.98 °C	132.99 °C	132.98 °C	132.99 °C
09:31:00		133.44 °C	133.39 °C	133.42 °C	133.37 °C	133.36 °C	133.31 °C	133.28 °C	133.30 °C	133.37 °C	133.37 °C	133.42 °C	133.39 °C
09:32:00		133.73 °C	133.68 °C	133.71 °C	133.66 °C	133.64 °C	133.59 °C	133.58 °C	133.61 °C	133.67 °C	133.67 °C	133.72 °C	133.71 °C
09:33:00		133.91 °C	133.86 °C	133.89 °C	133.84 °C	133.82 °C	133.77 °C	133.77 °C	133.80 °C	133.85 °C	133.85 °C	133.89 °C	133.90 °C
09:33:08	*** End Exposure *** Manual	NICOLAS INGA											
	Stop Interval: Exp End												
		133.92 °C	133.88 °C	133.89 °C	133.85 °C	133.82 °C	133.78 °C	133.78 °C	133.82 °C	133.86 °C	133.86 °C	133.90 °C	133.91 °C
09:34:00		133.82 °C	133.77 °C	133.76 °C	133.73 °C	133.70 °C	133.66 °C	133.67 °C	133.71 °C	133.72 °C	133.72 °C	133.76 °C	133.79 °C
09:35:00		131.33 °C	131.36 °C	131.24 °C	131.30 °C	131.23 °C	131.20 °C	131.37 °C	131.53 °C	131.30 °C	131.36 °C	131.29 °C	131.49 °C
09:36:00		127.51 °C	127.57 °C	127.37 °C	127.44 °C	127.37 °C	127.36 °C	127.58 °C	127.79 °C	127.51 °C	127.59 °C	127.44 °C	127.72 °C
09:37:00		123.57 °C	123.64 °C	123.43 °C	123.49 °C	123.42 °C	123.41 °C	123.64 °C	123.87 °C	123.58 °C	123.66 °C	123.50 °C	123.78 °C
09:38:00		119.73 °C	119.77 °C	119.54 °C	119.60 °C	119.52 °C	119.51 °C	119.73 °C	119.97 °C	119.70 °C	119.77 °C	119.60 °C	119.88 °C
09:39:00		115.95 °C	116.01 °C	115.80 °C	115.86 °C	115.79 °C	115.78 °C	116.00 °C	116.22 °C	115.96 °C	116.03 °C	115.89 °C	116.15 °C
09:40:00		112.36 °C	112.42 °C	112.21 °C	112.26 °C	112.21 °C	112.19 °C	112.39 °C	112.62 °C	112.37 °C	112.45 °C	112.29 °C	112.55 °C
09:41:00		108.88 °C	108.94 °C	108.74 °C	108.78 °C	108.72 °C	108.71 °C	108.92 °C	109.13 °C	108.88 °C	108.96 °C	108.82 °C	109.07 °C
09:42:00		105.61 °C	105.65 °C	105.43 °C	105.47 °C	105.42 °C	105.40 °C	105.59 °C	105.81 °C	105.57 °C	105.65 °C	105.51 °C	105.74 °C
09:43:00		102.38 °C	102.44 °C	102.24 °C	102.28 °C	102.22 °C	102.21 °C	102.41 °C	102.62 °C	102.38 °C	102.46 °C	102.32 °C	102.54 °C
09:44:00		99.28 °C	99.33 °C	99.14 °C	99.18 °C	99.13 °C	99.11 °C	99.30 °C	99.50 °C	99.27 °C	99.36 °C	99.23 °C	99.44 °C
09:45:00		96.33 °C	96.40 °C	96.20 °C	96.23 °C	96.19 °C	96.16 °C	96.34 °C	96.54 °C	96.33 °C	96.41 °C	96.28 °C	96.48 °C
09:46:00		93.55 °C	93.58 °C	93.38 °C	93.41 °C	93.36 °C	93.35 °C	93.51 °C	93.71 °C	93.51 °C	93.57 °C	93.46 °C	93.66 °C
09:47:00		90.74 °C	90.80 °C	90.62 °C	90.66 °C	90.60 °C	90.59 °C	90.76 °C	90.94 °C	90.74 °C	90.82 °C	90.70 °C	90.89 °C
09:47:22	*** End Qualification *** Manual	NICOLAS INGA											
		89.82 °C	89.86 °C	89.68 °C	89.70 °C	89.66 °C	89.63 °C	89.81 °C	89.99 °C	89.79 °C	89.86 °C	89.75 °C	89.93 °C

Anexo 4

Certificación de la Potencia y Registro de apertura y uso de Reactivo LAL MIC-RGT-041
v1 Laboratorio Microbiología -Teva Perú

TEVA	Perú	CONTROL DE CALIDAD LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
CERTIFICACION DE LA POTENCIA Y REGISTRO DE APERTURA Y USO DEL REACTIVO LAL		
Lote de Reactivo LAL	: R1242L	Sensibilidad: 0,03 EU/mL
Lote del C. Estándar Endot.:	: EM34942	Fecha de ingreso: 2024-03-15
Lote de Agua LAL	: W P1001/WP100C	Fecha de verificación: 2024-09-26

N° Vial: 01 Fecha de Apertura: 2024-09-26 Fecha de Vencimiento: NOVIEMBRE 2026

Método: GEL - CLOT

	2λ	λ	λ/2	λ/4	Blanco
	0,06	0,03	0,015	0,0075	H ₂ O LAL
1	+	+	-	-	-
2	+	+	+	-	-
3	+	+	-	-	-
4	+	-	-	-	-

Promedio Geométrico de Sensibilidades (PGS)

Especificaciones USP vigente: $2\lambda \geq PGS \geq \lambda/2$ ($0,06 \geq PGS \geq 0,015$)

	Punto Final (PF)	Log PF
1	Log 0,03	-1,52
2	Log 0,015	-1,82
3	Log 0,03	-1,52
4	Log 0,06	-1,22
Σ Log PF		-6,08

Antilog (Σ Log PF / 4) = PGS = 0,03 EU/mL

Anexo 6

Trazabilidad de los resultados del análisis de detección de endotoxinas

Condición	Cepa	Grupo Análisis	Cantidad de viales de inóculo	Muestras	Resultado
Sin Esterilización	CONTROL POSITIVO <i>E. coli</i>				(+)
	CONTROL POSITIVO <i>S. enterica</i>				(+)
	CONTROL NEGATIVO				(-)
	<i>E. coli</i>	1	9 viales	EC1/198 – EC9/198	9 (-); 0 (+)
		2	9 viales	EC10/198 – EC18/198	9 (-); 0 (+)
		3	9 viales	EC19/198 – EC27/198	9 (-); 0 (+)
		4	9 viales	EC28/198 – EC36/198	9 (-); 0 (+)
		5	9 viales	EC37/198 – EC45/198	9 (-); 0 (+)
		6	9 viales	EC46/198 – EC54/198	9 (-); 0 (+)
		7	9 viales	EC55/198 – EC63/198	9 (-); 0 (+)
		8	9 viales	EC64/198 – EC72/198	9 (-); 0 (+)
		9	9 viales	EC73/198 – EC81/198	9 (-); 0 (+)
		10	9 viales	EC82/198 – EC90/198	9 (-); 0 (+)
		11	9 viales	EC91/198 – EC99/198	9 (-); 0 (+)
	<i>S. enterica</i>	12	9 viales	SE1/198 – SE9/198	9 (-); 0 (+)
		13	9 viales	SE10/198 – SE18/198	9 (-); 0 (+)
		14	9 viales	SE19/198 – SE27/198	9 (-); 0 (+)
		15	9 viales	SE28/198 – SE36/198	9 (-); 0 (+)
		16	9 viales	SE37/198 – SE45/198	9 (-); 0 (+)
		17	9 viales	SE46/198 – SE54/198	9 (-); 0 (+)
		18	9 viales	SE55/198 – SE63/198	9 (-); 0 (+)
		19	9 viales	SE64/198 – SE72/198	9 (-); 0 (+)
20		9 viales	SE73/198 – SE81/198	9 (-); 0 (+)	
21		9 viales	SE82/198 – SE90/198	9 (-); 0 (+)	
22		9 viales	SE91/198 – SE99/198	9 (-); 0 (+)	
Esterilizado 121 °C x 15 min	CONTROL POSITIVO <i>E. coli</i>				(+)
	CONTROL POSITIVO <i>S. enterica</i>				(+)
	CONTROL NEGATIVO				(-)
	<i>E. coli</i>	23	9 viales	EC100/198 – EC108/198	4 (-); 5 (+)
		24	9 viales	EC109/198 – EC117/198	5 (-); 4 (+)
		25	9 viales	EC118/198 – EC126/198	8 (-); 1 (+)
		26	9 viales	EC127/198 – EC135/198	5 (-); 4 (+)
		27	9 viales	EC136/198 – EC144/198	8 (-); 1 (+)
	<i>S. enterica</i>	28	9 viales	SE100/198 – SE108/198	4 (-); 5 (+)
		29	9 viales	SE109/198 – SE117/198	7 (-); 2 (+)
		30	9 viales	SE118/198 – SE126/198	8 (-); 1 (+)
		31	9 viales	SE127/198 – SE135/198	8 (-); 1 (+)
		32	9 viales	SE136/198 – SE144/198	7 (-); 2 (+)
33		9 viales	SE145/198 – SE153/198	8 (-); 1 (+)	

Esterilizado 134°C x 3 min	CONTROL POSITIVO <i>E. coli</i>			(+)	
	CONTROL POSITIVO <i>S. enterica</i>			(+)	
	CONTROL NEGATIVO			(-)	
	<i>E. coli</i>	34	9 viales	EC145/198 – EC153/198	3 (-); 6 (+)
		35	9 viales	EC154/198 – EC162/198	1 (-); 8 (+)
		36	9 viales	EC163/198 – EC171/198	2 (-); 7 (+)
		37	9 viales	EC172/198 – EC180/198	3 (-); 6 (+)
		38	9 viales	EC181/198 – EC189/198	2 (-); 7 (+)
		39	9 viales	EC190/198 – EC198/198	2 (-); 7 (+)
	<i>Salmonella enterica</i>	40	9 viales	SE154/198 – SE162/198	4 (-); 5 (+)
		41	9 viales	SE163/198 – SE171/198	6 (-); 3 (+)
		42	9 viales	SE172/198 – SE180/198	5 (-); 4 (+)
		43	9 viales	SE181/198 – SE189/198	3 (-); 6 (+)
44		9 viales	SE190/198 – SE198/198	2 (-); 7 (+)	

Leyenda: + = Formación de coágulo
- = No Formación de coágulo