

***Control de calidad microbiológica de  
los medicamentos en la normativa  
regulatoria europea: aspectos  
principales***

---



**Autor:** Iván Díaz Gascón

**Tutor:** José María Rodríguez Pachón

**Año académico:** 2019/2020

## ÍNDICE

|                                                                 |                |
|-----------------------------------------------------------------|----------------|
| ○ <b>Resumen</b>                                                | <b>pág. 2</b>  |
| ○ <b>Introducción</b>                                           | <b>pág. 3</b>  |
| ○ <b>Esterilidad</b>                                            | <b>pág. 4</b>  |
| ○ <b>Calidad microbiológica para preparaciones no estériles</b> | <b>pág. 7</b>  |
| ○ <b>Ensayo para endotoxinas bacterianas</b>                    | <b>pág. 13</b> |
| ○ <b>Conclusión</b>                                             | <b>pág. 19</b> |
| ○ <b>Bibliografía</b>                                           | <b>pág. 20</b> |

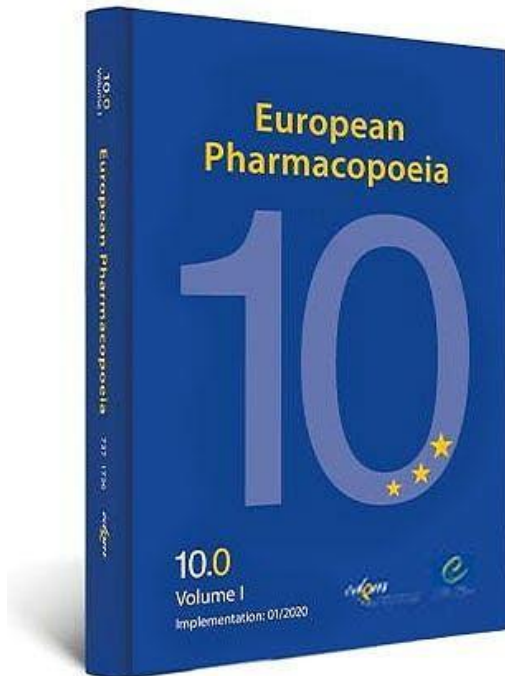
## RESUMEN

En este trabajo hemos llevado a cabo una revisión bibliográfica sobre algunos de los estándares y directrices de calidad microbiológica descritos en la Farmacopea Europea. No podemos hablar de calidad microbiológica sin definir la esterilidad y los métodos que hay para conseguirla. Este trabajo se ha centrado en dos aspectos que se relacionan con la calidad microbiológica: ensayos microbiológicos en preparaciones no estériles, con un ejemplo para que veamos cómo se realizaría (en nuestro caso con *Clostridium sporogenes*); y ensayos para determinar endotoxinas en distintas preparaciones, ya que estas son las causantes de los principales problemas cuando una preparación está contaminada por microorganismos, explicando su fundamento.

This project is based on a bibliographic review about some microbiological quality standards and guidelines described in the European Pharmacopoeia. It is not appropriate to talk about microbiological quality without mentioning sterility and which processes are available to assure it. This research has focused on two main aspects related to microbiological quality: microbiological tests in non-sterile preparations, with guidelines which allows us to know how it should be done (specifically *Clostridium sporogenes*); and tests to determine endotoxines on diverse preparations, as they cause the main problems when a preparation is contaminated by microorganisms, explaining its fundament.

# INTRODUCCIÓN

Todos los productos que salen de las cadenas de producción de las diferentes industrias tienen que cumplir unos estándares de calidad descritos por ley.



En nuestro caso vamos a adentrarnos en los controles de calidad microbiológica que se deben realizar, la normativa regulatoria vigente y algunos procedimientos en casos concretos.

Primero vamos a empezar hablando de la **farmacopea europea**

Esta farmacopea surgió bajo los auspicios del consejo de Europa, de acuerdo con los términos de la *convención de la elaboración de la farmacopea europea* y enmendados por los protocolos de la convención, firmados por 37 países, entre ellos España, y la Unión Europea de aquella época. Se creó en 1964.

La preparación de esta es responsabilidad de la comisión de la farmacopea europea, apoyada en el artículo 5 de la convención

mencionada anteriormente. Está compuesta de delegaciones fijadas por los países firmantes. Cada delegación tiene como máximo 3 miembros elegidos por su competencia en materias acorde con las funciones de la comisión. También admiten observadores a sus sesiones de acuerdo a las reglas de procedimientos, que ayudan a mejorar y perfeccionar la farmacopea, potenciando también la globalización.

La novena edición contiene cerca de 3000 monografías y textos generales, teniendo edición tanto física como digital. Actualmente se encuentra ya la décima edición disponible.

La comisión se encarga de 4 funciones especificadas por el artículo 6 de la convención:

- Determinar los principios generales aplicables a la elaboración de la Farmacopea Europea.
- Decidir métodos de análisis apropiados para ese objetivo.
- Para organizar la preparación de las monografías y añadir nuevas.
- Recomendar la fijación de determinados límites dentro de lo cual las decisiones de carácter técnico descritos en la farmacopea se deben implementar en los territorios de los países que estén implicados.

La dirección europea para la calidad de la medicina y el cuidado la salud (EDQM) da soporte a la comisión de la elaboración y revisión de los textos de la farmacopea mediante el secretario científico.

**El objetivo de la farmacopea es promover la salud pública mediante unos estándares de calidad y controles en las medicinas y sus componentes.** Estos estándares tienen

que ser apropiados para garantizar la seguridad del uso de los fármacos. Su existencia facilita la libre circulación de fármacos dentro de la Unión Europea. Las monografías y textos cumplen con:

- Lo demandado por las autoridades reguladoras
- Se comprometen con la calidad de los fármacos y sus componentes
- Se adaptan a los fabricantes y a sus componentes individuales

La sede de la comisión se encuentra en Estrasburgo, y las reglas generales para su interpretación se dan en el diario oficial de la Unión Europea. También podemos encontrarla en la web de la EDQM.

Ahora, tras esta breve introducción de cómo se creó la farmacopea y cuáles son sus objetivos, nos vamos a adentrar en el tema en sí.

Dado que el tema que nos abarca es amplio, el trabajo se va a centrar en explicar en definir qué es la esterilidad, qué métodos usamos para llegar a ella, evaluación de la calidad microbiológica en preparaciones no estériles y algunos de los ensayos descritos en la Farmacopea Europea para comprobar que la formulación está exenta de endotoxinas bacterianas.

## **ESTERILIDAD**

Se define como la destrucción completa o eliminación total de los microorganismos patógenos y saprofitos que se encuentran en el interior o en la superficie de objetos y sustancias.

En la farmacopea se aplican ensayos a sustancias, preparaciones o artículos que requieren de esterilidad, pero el resultado solo muestra si la muestra empleada está o no libre de microorganismos.

Estos ensayos se realizan bajo condiciones asépticas. Para poder lograr esas condiciones, el medio donde se realice el ensayo se tiene que adaptar a la vía en la cual se ha realizado el ensayo. Ello nos servirá para no contaminar el material a evaluar con microorganismos del medio que no sean susceptibles de encontrarse en la muestra a analizar

Las condiciones de trabajo en las que se han desarrollado dichos ensayos se monitorizan regularmente con un apropiado muestreo de la zona de trabajo y realizando los controles pertinentes para esa zona.

La farmacopea describe medios de cultivo y su preparación, o su equivalente comercial. Esos medios descritos en ella son apropiados para realizar los ensayos de esterilidad. Por ejemplo:

- El medio fluido de tioglicolato es apropiado para observar el crecimiento de bacterias anaeróbicas.
- El medio de digestión de caseína de soja es apropiado para observar el crecimiento de hongos y bacterias aeróbicas.

Podemos tener medios de cultivo que preparemos nosotros o que vengan ya preparados.

Estos medios deben pasar unos controles de esterilidad:

- Filtración a través de membrana: después de transferir el contenido a examinar a la membrana añadir un inóculo pequeño de microorganismos viables (menor de 100 UFC) a la porción final del diluyente estéril para enjuagar el filtro.
- Inoculación directa: después de transferir la muestra a examinar (normalmente la muestra es de origen veterinario) al medio de cultivo añadir un pequeño inóculo de microorganismos viables (menos de 100 UFC) al medio.

En ambos casos se usan como inóculos los microorganismos descritos, que son: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus brasiliensis*

## Métodos

Primero hablaremos de la **filtración a través de membrana**. Este ensayo debe realizarse con un tamaño de poro menor de 50 micrómetros. Si se cambiara el tamaño, se ajustarían los volúmenes para diluir y enjuagar la membrana. El aparato de filtración y las membranas se esterilizan en medios apropiados. Después se introduce la solución a esterilizar en el aparato y se filtra bajo condiciones de asepsia; esto permite la eliminación aséptica de la membrana para transferir al medio o ser susceptible de llevar fuera de la incubación después de añadir el medio de cultivo al aparato.

Se pueden añadir a la membrana soluciones acuosas, que pueden contener sustancias neutralizantes y/o sustancias apropiadas inactivadoras como en el caso de antibióticos. Estas soluciones se transfieren a los contenedores que van a ser examinados en membranas, si es necesario se añade después diluyente al volumen que se usara en el ensayo con un diluyente estéril apropiado, pero en ningún caso se usara menos de las cantidades del producto prescritas por la farmacopea.

Si el producto tiene propiedades antimicrobianas, se lavará la membrana mínimo 3 veces filtrando a través de la membrana cada vez que se use volumen del diluyente, no se excederá en más de 5 veces con 100 mililitros cada vez, aunque se demuestre que cada ciclo no elimina del todo la actividad antimicrobiana. Se transferirá la membrana entera a un medio de cultivo o se cortará en 2 partes iguales, donde cada una se llevará a 2 medios de cultivo; también se puede transferir medio de cultivo al aparato. Se cultivarán estas 3 opciones un mínimo de 14 días.

Cuando trabajamos con sólidos solubles, se utilizarán cantidades establecidas en la farmacopea para diluirlo.

En el caso de aceites y soluciones oleosas:

- Si son de baja viscosidad se filtrarán sin dilución sobre una membrana seca.
- Si son viscosos se diluirán lo necesario con un diluyente estéril como miristato de isopropilo, que no tiene propiedades antimicrobianas.

Se aplicará presión para que el aceite penetre, también podemos usar succión gradual. Se lavará la membrana 3 veces con 100 ml de solución estéril que contenga un agente emulsificante a concentración apropiada para el ensayo, como el polisorbato 80 a 10 g/L; después la membrana se llevará a un medio de cultivo, o como ocurre con las soluciones acuosas mencionadas anteriormente.

Con ungüentos y cremas se usarán diluyentes para llevarlo a concentraciones de 1 por ciento en miristato de isopropilo, calentando si es necesario a temperaturas no mayores

de 40°C, pudiendo calentarse hasta 44°C en casos excepcionales. Se filtrará después rápidamente y se procederá como se describe en aceites y soluciones oleosas.

Si trabajamos **inoculando directa al medio de cultivo**, se transfiere la cantidad suficiente de preparación como detalla la farmacopea al medio de cultivo, cuyo volumen no debe ser superior al 10 por ciento del volumen del medio salvo que este especificado. Si el producto a examinar tiene propiedades antimicrobianas, antes de empezar el ensayo se neutralizarán o se diluirán en cantidad suficiente. Cuando se necesita usar grandes cantidades de volumen se usarán medios de cultivo concentrados, incluso el medio de cultivo se podrá añadir directamente al producto en su contenedor en determinados casos:

- Líquidos oleosos: el medio que se usara llevara un agente emulsificante a concentración apropiada, como el polisorbato 80 a 10 g/L.
- Ungüentos y cremas: se diluirá hasta un 10 por ciento con un agente emulsificante apropiado en un diluyente estéril que contenga 1g/L de solución neutralizante de carne o caseína peptona.

Se incubarán los medios 14 días o más, observándose los medios durante el tiempo de incubación. Se agitarán los cultivos que contengan productos oleosos cada día. Cuando se usan medios fluidos de tioglicolato para detectar microorganismos anaeróbicos, se agitará o mezclará lo mínimo para mantener las condiciones anaeróbicas.

**Catgut y otras suturas de uso veterinario**: se usará para cada medio como mínimo las cantidades de producto especificadas, se abrirá el pack sellado usando precauciones asépticas y llevando 3 partes a 3 medios de cultivo diferentes. Cada parte será de 30 cm, cortando el inicio, el centro y el final de la hebra. Se usarán todas las hebras de los paquetes abiertos más recientemente, transfiriéndose cada hebra a un medio específico. Se usará medio suficiente para cubrir adecuadamente el material a examinar, de 20 a 150 ml.

## **Observación e interpretación de los resultados**

Se examinarán las muestras a intervalos de tiempo determinados durante la incubación y a su conclusión para ver cambios macroscópicos que nos indiquen crecimiento microbiano. Si el medio se vuelve turbio, que no indica presencia o ausencia de microorganismos, tras 14 días después del inicio de la incubación, se transferirán porciones a otros medios de cultivo, para llevarlos a incubar mínimo 4 días.

Si no hay evidencia de crecimiento microbiano, el producto cumple con el ensayo de esterilidad, si hay evidencia no cumple con el ensayo salvo que se demuestre que el ensayo no es válido por causas ajenas al producto. El ensayo se considerará no valido si:

- Los datos de monitorización microbiológica revelan fallos.
- La revisión del procedimiento usado revela fallos.
- Se encuentra crecimiento microbiológico en los controles negativos.
- Después de identificar los microorganismos aislados, se conoce que su crecimiento se relaciona con los fallos respecto al material y/o técnicas utilizadas.

Si el ensayo se invalida, se debe repetir con el mismo número de unidades que el original.

Si no se encuentra evidencia de crecimiento en el ensayo repetido, el producto examinado cumple con el ensayo de esterilidad; si, por el contrario, en la repetición encontramos crecimiento, el producto no cumple con el ensayo de esterilidad.

## **Guías para usar ensayos de esterilidad**

El objetivo de este ensayo es proporcionar un análisis de control independiente para verificar que un material en concreto cumple con los requerimientos de la Farmacopea Europea, al cual están obligados a cumplir todas las empresas farmacéuticas.

Para lograr condiciones asépticas para la realización del ensayo se puede lograr usando, por ejemplo, una cabina de clase A de flujo laminar localizada justo después de un área limpia de clase B. Pero también con los ensayos descritos anteriormente

El nivel de garantía a proporcionar para un resultado satisfactorio de este ensayo aplicado a un lote, va en función de la homogeneidad del mismo, las condiciones de fabricación y la eficiencia en el plan de muestreo. Un lote se define como una colección homogénea de contenedores sellados, preparados de tal manera que el riesgo de contaminación es el mismo para cada unidad.

El método de rellenado de medios debe usarse para evaluar el proceso de producción en condiciones asépticas. A parte, el ensayo de esterilidad es el único método analítico disponible para productos preparados bajo condiciones asépticas y el único disponible para las autoridades que tienen que examinar la esterilidad de un espécimen del lote.

Sin embargo, este ensayo no puede detectar bajos niveles de contaminación.

El ensayo de esterilidad se interpreta de la siguiente forma: se asume que el resultado de la muestra representa a todo el lote, ya que no podemos analizarlo entero. En el caso de producción en condiciones asépticas, se analizan muestras en el principio y final del proceso, y si hay alguna intervención significativa también.

Las técnicas microbiológicas y bioquímicas convencionales son satisfactorias para identificar microorganismos revelados en el ensayo de esterilidad. Para invalidar un ensayo, por fallos en el material y/o técnicas empleadas, se necesita demostrar mediante técnicas muy sensibles que el microorganismo aislado en el ensayo del lote es idéntico al aislado en el ensayo del material utilizado y en el ensayo del medio en el que se trabaja. También podemos usar técnicas moleculares mediante homología RNA/DNA, para demostrar que dos microorganismos aislados de dos muestras del proceso son iguales o no.

## **CALIDAD MICROBIOLÓGICA PARA PREPARACIONES FARMACÉUTICAS NO ESTERILES Y SUSTANCIAS DE USO FARMACÉUTICO**

La presencia de microorganismos en preparaciones no estériles puede reducir su potencia, inactivar la actividad terapéutica o incluso dañar la salud del paciente. Estos productos deben tener baja carga biológica para poder usarse, y debemos usar correctamente las guías de buenas prácticas durante la producción, almacenamiento y distribución.

Los criterios aceptados en relación a la carga microbiológica se basan en el número total de microorganismos aerobios y el combinado de levaduras totales por modulo, cuyos niveles para cada microorganismo vienen dados por la farmacopea. Los criterios de aceptación para la calidad microbiológica son:

- $10^1$  CFU, máximo aceptable de 20 colonias
- $10^2$  CFU, máximo aceptable de 200 colonias
- $10^3$  CFU, máximo aceptable de 2000, etc.

Si se ha visto que ninguno de los ensayos descritos permite una enumeración válida de los microorganismos a los niveles descritos, se usa un método validado con límites de detección lo más precisos posibles a los criterios de aceptación indicados.

También la presencia o ausencia de microorganismo se evalúa en función de:

- Uso al que se destina el producto: el riesgo varía según la vía de administración.
- La naturaleza del producto: si permite el crecimiento de microorganismos.
- Método de aplicación.
- Uso de inmunosupresores o corticoides.
- Presencia de enfermedad, órganos dañados, etc.

Se necesita una evaluación de los riesgos basados en factores relevantes por personal especializado en microbiología y en la interpretación de los resultados. Para material crudo, su evaluación toma en cuenta el proceso que el producto ha sufrido, la tecnología utilizada para analizarlo y la calidad deseada para el material disponible.

## **Ensayos microbiológicos para preparaciones no estériles**

La mayoría están destinados a detectar bacterias mesófilas y hongos que crezcan en condiciones aeróbicas. Principalmente estos controles se diseñaron para determinar si una sustancia o producto cumplía con una calidad microbiológica establecida. Estos métodos no se aplican a productos que contengan microorganismos viables como ingredientes de la preparación.

Las precauciones a tomar para evitar contaminación microbiológica deben ser tales que no afecten a ningún microorganismo que vaya a ser revelado en estos ensayos.

Si el producto tiene actividad antimicrobiana debe reducirse lo máximo posible o neutralizarla. Si se necesita usar para ello inactivadores, su eficacia y ausencia de toxicidad para los microorganismos debe ser demostrada.

### Métodos

Se usará la filtración a través de membrana, el método del recuento de placas y el del número más probable. Como el menos preciso es el método del número más probable, aunque sirve para cerciorarnos en productos con una carga biológica baja, elegiremos siempre la filtración a través de membrana y el del recuento de placas.

*La elección del método se basa en una serie de factores, como la naturaleza del producto y el límite de microorganismos. El método elegido debe permitir analizar una muestra lo suficientemente amplia para decidir si un lote cumple con las especificaciones requeridas. La idoneidad del método elegido debe estar estandarizado.*



La habilidad del ensayo para detectar crecimiento microbiano en un producto debe estar establecido, así como su idoneidad según condiciones del proceso o del producto. Así el proceso se realizaría de la siguiente forma:

- Empezaremos preparando las cepas control tal como se establece en la farmacopea, suspensiones estandarizadas estables comerciales o las prepararíamos nosotros mismos. Se usarán técnicas de mantenimiento para que los microorganismos sean viables y puedan usarse como inóculos, que deben ser como mínimo 5 veces inferior al original. Así se harán crecer cada cepa de bacteria u hongo por separado según esta especificado.
- La suspensión llevará tampón NaCl - peptona con un pH de 7; o un tampón fosfato con pH 7,2. En determinados casos añadiremos otras cosas, como en *Aspergillus brasiliensis*, que lleva un 0,05% de polisorbato 80.
- Necesitaremos de un control negativo, donde no crezcan los microorganismos. Si aquí hubiera crecimiento, el ensayo se invalidaría y deberíamos investigar la causa del fallo.
- Usaremos dos tipos de medios en función del microorganismo que vayamos a buscar: caseína de soja digerida en caldo, en agar o medios Sabouraud-dextrosa

## **Preparación de la muestra**

La preparación de la muestra dependerá de las características físicas del producto a examinar:

- Para productos solubles en agua, se diluirán al 10% en los dos tampones descritos anteriormente o en caldo de caseína de soja digerida.
- Para productos no grasos insolubles en agua, se realizará la misma dilución que en el apartado anterior con los mismos productos, aparte de usar un surfactante a concentración de 1 g/L de polisorbato 80.
- Para productos grasos, disolverlos en miristato de isopropilo, esterilizar por filtración o mezclarlo para que sea examinado con una cantidad mínima de polisorbato 80 estéril u otro no-inhibidor estéril que sea un agente surfactante. Calentar si fuera necesario a una temperatura inferior a 40°C, llegando a 45°C en casos excepcionales. Mezclarlo, y si fuera necesario, mantenerlo en baño de agua. Después añadir suficiente diluyente precalentado para hacer una dilución 1:10. Se prepararán diluciones seriadas con este diluyente con una concentración adecuada de polisorbato 80 estéril u otro surfactante.
- Para fluidos o sólidos en forma de aerosol, se transferirán asépticamente a un filtro de membrana o contenedor estéril para muestrear rápido. Se usarán en todos los contenedores un número determinado de dosis.
- Para parches transdérmicos, se quitará primero la lámina protectora y se pondrá la parte adhesiva hacia arriba en un vaso estéril o en bandejas de plástico. Se cubrirá la superficie adhesiva con un material estéril poroso, como una gasa estéril, para prevenir que los parches se queden pegados, y los llevaremos a un volumen suficiente del diluyente elegido que contenga inactivadores tales como polisorbato 80 y/o lecitina; después se agitará vigorosamente durante 30 min.

Una vez hemos visto cómo preparar las muestras, tanto al control como a la muestra se le añadirá un volumen suficiente de suspensión microbiana para obtener un inóculo que no tenga más de 100 CFU. El volumen de la suspensión no debe exceder el 1% del volumen del diluyente.

Debe usarse la dilución más baja posible de la muestra para el ensayo. Cuando no es posible debido a la actividad antimicrobiana o a la baja solubilidad se deben desarrollar protocolos rápidos. Si la inhibición del crecimiento no se pudiera evitar de otra manera, la alícuota de suspensión microbiana se añadirá después de neutralizar, diluir o filtrar.

Si el crecimiento está inhibido, se modificará el procedimiento para la enumeración particular del ensayo con el fin de asegurar la validez de los resultados. Estas modificaciones incluyen cambios como aumento del volumen del diluyente, incorporación de agentes neutralizantes, uso de membrana de filtración o combinaciones de las anteriormente mencionadas.

- Agentes neutralizantes: se usan para neutralizar la actividad de los agentes antimicrobianos, se añadirán a los diluyentes adecuados o al medio de cultivo tras esterilización. Para usarse debe haber evidencia de su eficacia y de su ausencia de toxicidad para los microorganismos, demostrada por un blanco con este agente y sin producto.

Si no se pudiera usar ningún método de neutralización, se asume que el fallo en aislar el organismo inoculado se atribuye a la actividad antimicrobiana del producto, lo que servirá para decir que el producto es probable que no se contamine por los microorganismos inoculados.

También es posible que solo inhiba ciertos microorganismos, pero no todos los que se analizan en el ensayo, entonces se diluirá el producto a la mayor dilución posible compatible con el crecimiento microbiano y el criterio específico de aceptación.

## **Recuento de microorganismos en presencia de producto**

- Membrana de filtración: tendrá un tamaño de poro menor de 45 micrómetros, su material elegido tendrá eficiencia en la retención de bacterias y no estará afectado por los componentes de la muestra que van a ser investigados. Para cada microorganismo se usará un filtro de membrana. Se transferirá la cantidad suficiente de muestra a la membrana, filtrándose e inmediatamente después se enjuagará con un volumen apropiado del diluyente. Para contar el total de microorganismo aeróbicos el filtro será llevado a una superficie de caseína de soja digerida en agar; y para la determinación total de la combinación de módulos se transferirá a un medio de Sabouraud-dextrosa en agar, incubándose como se ha descrito anteriormente.
- Método de recuento de placas: se realizará en los dos medios anteriores por duplicado y se contarán para ver los resultados.
- Método de verter la placa: en placas Petri de 9 cm de diámetro se añadirá 1 ml de muestra preparada y 15-20 ml de caseína de soja digerida en agar o Sabouraud-dextrosa agar, ambos que no rebasen los 45°C. Si se usa una placa Petri mayor de 9cm de diámetro, se usarán los mismos productos descritos, pero en mayor cantidad, siempre respetando las proporciones especificadas
- Método de extensión superficial o siembre en superficie: se realizará en una placa Petri, de 9 cm de diámetro, con 15-20 ml de los diluyentes citados anteriormente en el

método anterior. Se secarán las placas. Se usarán 2 placas, y se extenderán sobre la superficie un volumen de 0,1 ml aproximadamente, incubándose como se ha descrito anteriormente.

- **Método numérico más probables:** la precisión y exactitud de este método es menor que la filtración a través de membrana o el método de verter la placa. Solo se reserva su uso para enumerar TAMC en situaciones donde otros métodos no están disponibles. Se preparan 3 diluciones 1:10 seriadas del producto, para cada nivel de dilución, se usarán 3 alícuotas de 1 g o 1 ml para inocular en 3 tubos con 9-10ml de caseína de soja digerida en caldo, si es necesario se usarán surfactantes o inactivadores antimicrobianos. Si se preparan 3 niveles de dilución, se inocularán 9 tubos. Se incubarán a 30-35°C como máximo 3 días. Si fuera difícil leer los resultados se podría incubar en un subcultivo de caseína de soja digerida en agar durante 1-2 días a la misma temperatura. Después determinaremos el número más probable de microorganismos por gramo mililitro del producto examinado

## Resultados e interpretación

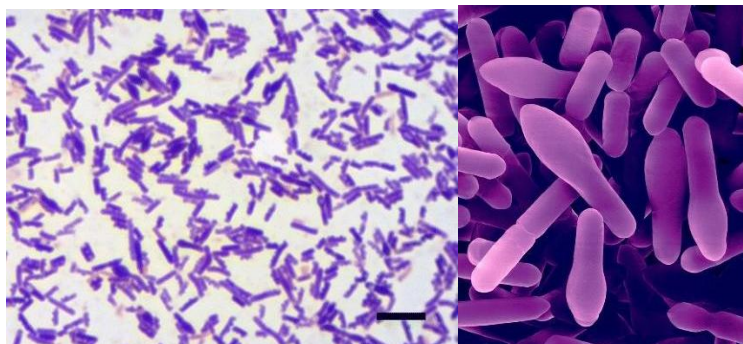
Cuando se verifica la susceptibilidad del método de la filtración a través de membrana o del recuento de placas, un recuento de alguno de los organismos en uno de los ensayos no debe diferir del otro en un factor mayor de 2 del valor del control definido anteriormente en ausencia del producto. Cuando se verifique la idoneidad del método numérico más probable, el valor calculado del inoculo debe ser parecido a los resultados obtenidos en nuestro control con un intervalo de confianza del 95 %.

Si en los criterios mencionados anteriormente no se puede conocer uno o varios microorganismos examinados con alguno de los métodos descritos, se usarán los métodos y condiciones que estén más cercanos a los criterios usados en el ensayo del producto.

Ahora vamos a ver un ejemplo de cómo se realizaría un ensayo para *Clostridium sporogenes*. Hemos elegido este caso por relatar cómo se realizaría en el caso de una bacteria anaeróbica, ya que estos métodos principalmente son para bacterias aeróbicas.

## Ensayo específico para *Clostridium sporogenes*

Primero vamos a empezar hablando de la bacteria: es una especie Gram positiva, que pertenece al género *Clostridium*; es una bacteria anaeróbica en forma de bastón que produce endosporas subterráneas ovales y se encuentra comúnmente en el suelo.



El ensayo que vamos a realizar nos va ayudar para determinar la ausencia del microorganismo o que su presencia este dentro de los límites aceptables para que el

producto examinado pase las condiciones necesarias para considerar su calidad microbiológica adecuada.

El primer paso será preparar las cepas control, que nos servirá para comparar con los resultados del ensayo en nuestro producto. Estas cepas en el caso de *Clostridium* se desarrollan bajo condiciones anaeróbicas y en un medio reforzado específico para *Clostridia*, en el que se incubaran los microorganismos a 30-35°C durante 24-48 h. Como alternativa tenemos la posibilidad de preparar una suspensión fresca de células vegetativas y después diluir esta suspensión; este podrá ser nuestro inóculo de esporas estable, que se deberán mantener entre 2-8°C durante un período validado de tiempo de incubación.

El segundo paso será obtener el control negativo, aquí usaremos el diluyente escogido para desarrollar nuestro ensayo. En él no debe aparecer crecimiento de *Clostridia*; un fallo aquí supone una investigación de todo el ensayo para ver donde se ha cometido un error.

En el tercer paso favoreceremos el crecimiento de la bacteria en cuestión e inhibiremos las propiedades del medio que no lo promuevan. Debemos examinar cada lote en diferentes medios preparados tanto deshidratados como con todos sus ingredientes, pero con algunas particularidades:

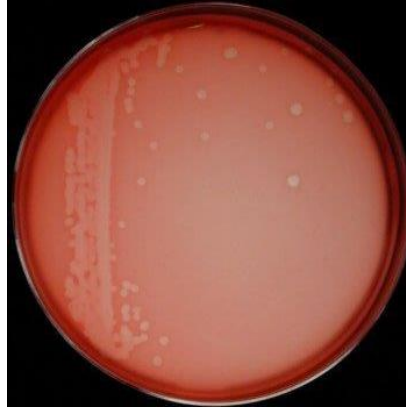
- Ensayo de crecimiento para medio líquido: inocularemos una pequeña porción de microorganismos (menor de 100 UFC) en un medio líquido adecuado a la temperatura especificada e incubaremos el menor tiempo posible que nos indique el ensayo. Este crecimiento se acompañará del crecimiento de las cepas control.
- Cuando queramos favorecer el crecimiento en medios sólidos, usaremos la siembra en superficie inoculando, igual que para el medio líquido, una pequeña porción (menos de 100 UFC) de microorganismos en cada placa (ya que como vimos anteriormente en este ensayo se usan 2 placas Petri) en un medio apropiado e incubándose a una temperatura determinada y el menor tiempo posible indicado.
- Comprobaremos también si un medio inhibe o no el crecimiento microbiano. Si al inocularlo, y tras su incubación, no observamos crecimiento, deduciremos que el medio tiene sustancias que inhiben el crecimiento y deberemos cambiar de medio o inhibir esas sustancias.
- Por último, un medio puede ser muy recomendado para el crecimiento del microorganismo si al hacer la siembra de superficie observamos crecimiento de colonias, y estas se parecen a las de ensayos anteriores en apariencia y los resultados obtenidos en determinadas reacciones son los mismos.

Ahora en la práctica, ¿Cómo realizaremos el ensayo?

Prepararemos la muestra usando una dilución 1:10 en un volumen mínimo de 20 ml, de una cantidad mayor de 2 gramos o mililitros del producto a examinar. Después esta dilución la dividiremos en 2 porciones de 10 ml; una de ellas la calentaremos a 80°C durante 10 minutos y después la enfriaremos rápidamente; la otra no sufrirá ningún tratamiento térmico. Cada porción irá acompañada de su cepa control.

Después una de las 2 porciones será llevada al medio reforzado para *Clostridia*, donde se incubará a 30-35°C durante 48 h; también le ocurrirá esto a la cepa control. Después de esto, se realizarán subcultivos, tanto de la muestra como de la cepa control en Columbia agar y se incubarán a 35°C durante 48-72 h bajo condiciones anaeróbicas.

Para comprobar que las colonias obtenidas son de *Clostridia*, realizaremos la prueba de la catalasa, la cual dará negativa. Estos resultados deberán aparecer en nuestra cepa control, mientras que, en nuestra muestra, para que cumpla con los criterios de calidad microbiológica, no deberá aparecer. Las formas de estas colonias son blanquecinas, redondeadas y con la formación de un velo.



Por último, vamos a describir los dos medios usados en el ensayo:

- Medio reforzado para *Clostridia*: 10 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 3 g de extracto de levadura, 1 g de almidón soluble, 0,5 g de clorhidrato de cisteína, 5 g de cloruro sódico, 3 g de acetato de sodio, 0,5 g de agar y 1 L de agua purificada. El modo a proceder será hidratar primero el agar, disolviéndolo previo calentamiento, levándolo a hervir. Si se necesita ajustar el pH, se hará tras la esterilización ajustándolo a  $6,8 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . se esterilizará en autoclave usando ciclos validados.
- Columbia agar: 10 g de caseína obtenida por digestión pancreática, 5 g de extracto de carne obtenido por digestión péptica, 3 g de extracto de corazón obtenido por digestión pancreática, 5 g de extracto de levadura, 1 g de almidón de maíz, 5 g de cloruro sódico, entre 10 y 15 g de agar según la gelificación que se quiera obtener, y 1 L de agua purificada. Al igual que antes se hidratará el agar previo calentamiento hasta llevarlo a hervir, si se necesita ajustar el pH se realizará tras esterilización en el autoclave, usando ciclos validados, y tornará a un valor de  $7,3 \pm 0,2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . se dejará enfriar hasta  $45 - 50^{\circ}\text{C}$  y se añadirá si es necesario 20 mg de sulfato de gentamicina.

En ambos medios, una vez que el agar este disuelto, se añadirán el resto de ingredientes, se mezclarán, y serán llevados a la autoclave para su esterilización y posterior ajuste de pH.

## **ENSAYO PARA ENDOTOXINAS BACTERIANAS**

Las endotoxinas más comunes que contaminan los productos farmacéuticos y provocan toxicidad y pirogénesis son endotoxinas de bacterias Gram negativas, que son los **lipopolisacáridos**; por eso se debe demostrar que la sustancia o producto en cuestión está libre de endotoxinas o de componentes pirogénicos.

Aun así, las endotoxinas pueden enmascarse por factores de interferencia como son las reacciones entre las endotoxinas, los reactivos empleados en el ensayo y el lisado de amebocitos; y también por las condiciones o el tiempo de almacenaje. Por ello debemos comprobar que estos factores no interfieren en la detección de las endotoxinas. También hay que tener cuidado con el material que usemos para desarrollar el ensayo, siendo los materiales de plástico los materiales que más interferencias provoquen.

Estos ensayos se usan para detectar o cuantificar endotoxinas de bacterias Gram negativas usando el lisado de amebocitos del cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*). Este control lo podemos llevar a cabo por tres técnicas:

- Técnica gel-clot: consiste en la formación de un gel, donde nos podemos basar en detectar una cantidad límite o cuantificar la cantidad presente en la muestra.
- Turbidez: si cuando mezclamos la muestra con un sustrato endógeno aparece o no turbidez; pudiendo realizar esta técnica estudiando la cinética de aparición o mediante el método punto final, cuando finaliza el proceso de formación de la turbidez
- Técnica cromogénica: aparición de color después de mezclar la muestra con un complejo péptido-cromógeno, estudiando su cinética o mediante la técnica punto final.

Se puede proceder usando cualquier método de los mencionados, pero en caso de duda el método de referencia siempre va a ser el **Método A** reflejado en la farmacopea, que se basa en la técnica gel-clot para detectar una cantidad que se corresponde con el límite especificado. En nuestro caso sólo nos fijaremos en los métodos A y B.

Method A. Gel-clot method: limit test  
Method B. Gel-clot method: quantitative test  
Method C. Turbidimetric kinetic method  
Method D. Chromogenic kinetic method  
Method E. Chromogenic end-point method  
Method F. Turbidimetric end-point method

## Procedimiento

- 1. Aparatos y material: todo material de cristal y todo aquel, aunque no sea de cristal, que no se vea afectado por altas temperaturas, debe despirogenizarse mediante un proceso validado, en el que se determinen mínimos de tiempo y temperatura; normalmente se establece que permanezcan durante un mínimo de 30 minutos a 250°C. Si se usa material de plástico, como placas de microtitulación o pipetas automáticas, debe demostrarse que están libres de endotoxinas detectables y que no interfieren en los resultados obtenidos por el ensayo.
- 2. Soluciones para el ensayo:
  - Lisado de amebocitos: liofilizado obtenido del lisado de amebocitos del cangrejo de herradura, es un producto fabricado de acuerdo con la regulación en vigor. Este producto reacciona con  $\beta$ -glucanos junto a endotoxinas. Hay otros lisados que no reaccionan con estos glucanos porque se les ha eliminado el factor G, que es el que reacciona.
  - Solución de lisado: el lisado anterior se disuelve en agua B.E.T en la cantidad recomendada por el fabricante y con agitación suave. Esta solución se puede refrigerar o congelar según las indicaciones del fabricante.
  - Agua B.E.T.: agua usada en el ensayo de endotoxinas bacterianas (*bacterial endotoxins test*), este tipo de agua no reacciona con el lisado ni con ningún producto empleado en el ensayo. Es agua estéril libre de endotoxinas. Se obtiene por destilación u osmosis inversa.

- 3. Preparación de la solución madre de endotoxina estándar: se prepara en base a una endotoxina de referencia, calibrada según un Estándar Internacional, como la **endotoxina estándar BRP**. Se expresan en unidades internacionales (UI), cuya equivalencia se establece en la OMS (Organización Mundial de la Salud)
- 4. Preparación de la solución de endotoxina estándar para el ensayo: tras mezclar vigorosamente la solución madre, se preparan diluciones usando agua B.E.T. se deben usar estas diluciones lo antes posible para evitar perder actividad por adsorción.
- 5. Preparación de las muestras a examinar: las sustancias activas o productos medicinales se disuelven en agua B.E.T.; algunos productos se disolverán en otras soluciones acuosas. Si se necesita ajustar el pH de la mezcla del lisado y la muestra a un rango de pH específico por el fabricante del lisado (normalmente entre 6,0 y 8,0), se usará ácido, base o un tampón adecuado; siempre se usará el recomendado por el fabricante. Los ácidos y bases, si se usan, deben antes diluirse a partir de un concentrado con agua B.E.T en recipientes libres de endotoxinas; los tampones también deben estar libres de endotoxinas y factores que interfieran en los resultados obtenidos en el ensayo.
- 6. Determinación de la máxima dilución posible: ¿qué dilución hay que hacer de sustancia o producto a examinar para obtener la máxima garantía de que un resultado negativo nos garantice que la concentración de endotoxina en la muestra es menor que el límite fijado, y que un resultado positivo signifique que el lisado detecta una concentración de endotoxina igual o mayor al límite fijado? Esta dilución depende del límite de endotoxina y de la sensibilidad del lisado:

$$MVD = \frac{\text{endotoxin limit} \times \text{concentration of test solution}}{\lambda}$$

**Límite de endotoxina:** límite fijado para sustancias activas que se administran vía parenteral definidas en base a una dosis según la fórmula:

$$\frac{M}{K} = \lambda$$

K: dosis pirogénica de endotoxina por kg de peso de un sujeto

M: dosis máxima posible en bolus del producto a examinar por kg de peso

Este límite debe definirse al principio del ensayo, para saber si la concentración de endotoxina está por encima o debajo de él. Cuando el producto se inyecta a intervalos frecuentes o se administra en infusión continuamente, M corresponde con la dosis máxima total administrada por hora. K viene definida por la siguiente grafica

Table 5.1.10.-1

| Route of administration                                               | K                                             |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Intravenous                                                           | 5.0 IU of endotoxin per kilogram of body mass |
| Intravenous for radiopharmaceuticals                                  | 2.5 IU of endotoxin per kilogram of body mass |
| Intrathecal                                                           | 0.2 IU of endotoxin per kilogram of body mass |
| Parenteral formulations administered per square metre of body surface | 100 IU/m <sup>2</sup>                         |

Para establecer un límite de concentración de endotoxinas hay que seguir algunas consideraciones:

- Calcular la máxima cantidad posible
- Límite fijado en la monografía de una sustancia en concreto. Este límite se puede lograr en un entorno controlado, por lo tanto, puede no coincidir con el que hayamos calculado, pero siempre puede ocurrir que el fabricante proponga un límite más estricto que el que aparezca en la monografía
- Capacidad del proceso para reducir o eliminar las endotoxinas bacterianas durante su fabricación, lo que podría reducir los límites de endotoxinas para procesos específicos
- Requerimientos adicionales de seguridad para poblaciones específicas, como la población pediátrica; o requerimientos especiales por una zona o por las autoridades competentes.
- Componentes usados en función de la formulación del producto, como diluentes o reconstituyentes.

#### **Concentración de la solución para el ensayo:**

- En mg/ml cuando el límite de endotoxinas este especificado en unidades de masa (IU/mg).
- En unidades/ml cuando se especifique el límite en unidades de actividad biológica (IU/unidades).
- En ml/ml si el límite se especifica en volumen (IU/ml).

**$\lambda$ :** sensibilidad del marcador lisado en la técnica de formación de gel (IU/ml) o concentración mínima usada en la curva estándar en técnicas cromogénicas o basadas en la aparición de turbidez.

#### **Técnica gel-clot (métodos A y B)**

Esta técnica permite detectar o cuantificar endotoxinas, y se basa en la gelificación del lisado en presencia de endotoxinas. La concentración mínima requerida de endotoxina para provocar la gelificación del lisado bajo condiciones estandarizadas se conoce como la sensibilidad del marcador lisado ( $\lambda$ ). Para asegurar la precisión y validez del ensayo, se confirma esta sensibilidad y se realiza el ensayo para factores de interferencia como se describe a continuación.

##### **1) Preparación del ensayo**

###### **Confirmación de la sensibilidad del marcador lisado**

En cuatro réplicas, expresadas en IU/ml, se realizará un ensayo para confirmar la sensibilidad de la solución lisada que se usará en el ensayo. Se debe realizar cuando se use un nuevo lote o cuando haya algún cambio en las condiciones del ensayo que puedan afectar a su desarrollo.

Se prepararán cuatro soluciones estándar a cuatro concentraciones diferentes equivalentes a  $2\lambda$ ,  $\lambda$ ,  $0,5\lambda$  y  $0,25\lambda$  diluyendo la solución madre de endotoxinas con agua B.E.T.



Mezclaremos un volumen de la solución de lisado con un volumen igual a 1 de la solución estándar (0,1 ml que irán en alícuotas) en cada tubo. Cuando se usen viales de ensayo solos o ampollas que contengan lisado liofilizado, añadiremos solución estándar directamente al vial o ampolla. Incubaremos la reacción mezclada durante un periodo constante acorde a las recomendaciones del fabricante (normalmente 37 +/- 1°C durante 60 +/- 2 minutos), evitando la vibración.

Analizaremos la integridad del gel: para tubos, coger cada tubo directamente del incubador e invertir 180° en un solo movimiento y suavemente. Si se forma un gel firme que permanece fijo aun invirtiéndolo, se anota como resultado positivo. Si el gel al invertirlo no se queda fijo, lo tomamos como resultado negativo.

El ensayo se considera válido cuando la concentración más baja de solución estándar muestra un resultado negativo en todos los ensayos replicados.

La técnica punto final es la concentración más baja en una serie de concentraciones decrecientes de endotoxina estándar que gelifica el lisado. Debe determinarse la geometría, de la cual obtendremos la concentración, calculándolo con el logaritmo de las concentraciones punto final de cuatro series diluidas, tomando el antilogaritmo de esos valores como se indica:

$$\text{Geometric mean end-point concentration} = \text{antilog} \frac{\sum e}{f}$$

$\sum e$  = sum of the  $\log_{10}$  end-point concentrations of the dilution series used,  
 $f$  = number of replicates.

Esto es la medida de la sensibilidad de la solución lisada (IU/ml). Si no es menor de 0,5  $\lambda$  ni mayor que 2  $\lambda$ , se confirma la sensibilidad y se usará en los ensayos que vayamos a realizar con este lisado.

### **Ensayo para los factores de interferencia**

El objetivo es comprobar que la sensibilidad del marcador lisado no varía en presencia o ausencia del producto o sustancia a examinar.

Se preparan las diluciones A, B, C y D como en la tabla 2.6.14-1 y se usa la solución de ensayo en una dilución menor al MVD, que no contenga ninguna endotoxina detectable, y se operará como se describe en el apartado anterior. El significado geométrico mediante la técnica punto final descrito en el apartado anterior de las soluciones B y C será determinado.

El ensayo de factores de interferencia se debe repetir cuando se produzca algún cambio en las condiciones experimentales que puedan influir en el resultado del ensayo.

Se considerará válido cuando las diluciones A y D no muestren reacción y C confirme la sensibilidad del marcador de lisado.

Si la sensibilidad determinada con B no es ni menor de 0,5  $\lambda$  ni mayor de 2  $\lambda$ , el ensayo no contiene factores de interferencia relacionados con las condiciones experimentales usadas. De otra manera, la solución de ensayo interfiere en su realización.

Si la preparación a examinar interfiere con el ensayo y se encuentra a una dilución menor que el MVD, repetiremos el ensayo de factores de interferencia usando una dilución mayor pero que no exceda el MVD. A mayor sensibilidad se permite una mayor dilución de la preparación a examinar, y este hecho puede contribuir a la eliminación de interferencias.

Las interferencias pueden eliminarse con un tratamiento idóneo previo y validado, tales como: filtración, neutralización, diálisis o calor. Para elegir el tratamiento más efectivo que elimine interferencias sin perder endotoxinas, se debe repetir el ensayo de factores de interferencia usando la muestra examinada, a la que se ha añadido la endotoxina estándar y que ha sido sometida al tratamiento elegido.

| Solution | Endotoxin concentration/Solution to which endotoxin is added | Diluent       | Dilution factor | Endotoxin concentration | Number of replicates |
|----------|--------------------------------------------------------------|---------------|-----------------|-------------------------|----------------------|
| A        | None/Test solution                                           | -             | -               | -                       | 4                    |
| B        | 2λ/Test solution                                             | Test solution | 1               | 2λ                      | 4                    |
|          |                                                              |               | 2               | 1λ                      | 4                    |
|          |                                                              |               | 4               | 0.5λ                    | 4                    |
|          |                                                              |               | 8               | 0.25λ                   | 4                    |
| C        | 2λ/Water for BET                                             | Water for BET | 1               | 2λ                      | 2                    |
|          |                                                              |               | 2               | 1λ                      | 2                    |
|          |                                                              |               | 4               | 0.5λ                    | 2                    |
|          |                                                              |               | 8               | 0.25λ                   | 2                    |
| D        | None/Water for BET                                           | -             | -               | -                       | 2                    |

Solution A = solution of the preparation being examined that is free of detectable endotoxins.

Solution B = test for interference.

Solution C = control of the labelled lysate sensitivity.

Solution D = negative control (water for BET).

## 2) Ensayo límite (método A)

Se prepararán cuatro soluciones como se muestra en la siguiente tabla y se realizará el ensayo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1 (preparación del ensayo y confirmación de λ).

Table 2.6.14.-2

| Solution | Endotoxin concentration/Solution to which endotoxin is added | Number of replicates |
|----------|--------------------------------------------------------------|----------------------|
| A        | None/Diluted test solution                                   | 2                    |
| B        | 2λ/Diluted test solution                                     | 2                    |
| C        | 2λ/Water for BET                                             | 2                    |
| D        | None/Water for BET                                           | 2                    |

Las soluciones A y B se prepararán con una dilución menor que el MVD. Las soluciones B y C tendrán la endotoxina estándar a una concentración correspondiente al doble de la sensibilidad del marcador lisado. La solución D consistirá únicamente en agua B.E.T.

El ensayo será válido cuando ambas réplicas de las soluciones B y C den positivo, mientras que las réplicas de la solución D sean negativas; al igual que las réplicas de A.

Si los resultados obtenidos en las soluciones de A fueran positivos, la preparación examinada no cumpliría con los requisitos para tomar el ensayo como válido. Si en una de las réplicas de la solución A fuera positivo, y la otra réplica fuera negativa, deberá repetirse el ensayo. En ambos casos mencionados, se deberá repetir el ensayo si ocurren estas dos situaciones.

Si el ensayo no cumpliera los requerimientos necesarios a ese grado de dilución, el ensayo deberá repetirse a una mayor dilución que la anterior, pero que no supere el MVD.

## 3) Ensayo cuantitativo (método B)

Este ensayo nos sirve para cuantificar las endotoxinas bacterianas en la solución a ensayar, mediante trituración, hacia una técnica de punto final. Se prepararán las soluciones indicadas en la tabla, bajo las condiciones descritas en la preparación del ensayo y la confirmación de λ.

Table 2.6.14.-3

| Solution | Endotoxin concentration/Solution to which endotoxin is added | Diluent       | Dilution factor | Endotoxin concentration | Number of replicates |
|----------|--------------------------------------------------------------|---------------|-----------------|-------------------------|----------------------|
| A        | None/Test solution                                           | Water for BET | 1               | -                       | 2                    |
|          |                                                              |               | 2               | -                       | 2                    |
|          |                                                              |               | 4               | -                       | 2                    |
|          |                                                              |               | 8               | -                       | 2                    |
| B        | 2λ/Test solution                                             |               | 1               | 2λ                      | 2                    |
| C        | 2λ/Water for BET                                             | Water for BET | 1               | 2λ                      | 2                    |
|          |                                                              |               | 2               | 1λ                      | 2                    |
|          |                                                              |               | 4               | 0.5λ                    | 2                    |
|          |                                                              |               | 8               | 0.25λ                   | 2                    |
| D        | None/Water for BET                                           | -             | -               | -                       | 2                    |

Solution A = test solution at the dilution, not exceeding the MVD, with which the test for interfering factors was carried out. Subsequent dilution of the test solution must not exceed the MVD. Use water for BET to make a dilution series of 4 tubes containing the test solution at concentrations of 1, 1/2, 1/4 and 1/8, relative to the dilution used in the test for interfering factors. Other dilutions up to the MVD may be used as appropriate.

Solution B = solution A containing standard endotoxin at a concentration of 2λ (positive product control).

Solution C = a dilution series of 4 tubes of water for BET containing the standard endotoxin at concentrations of 2λ, λ, 0.5λ and 0.25λ.

Solution D = water for BET (negative control).

El ensayo se considerará válido cuando se cumplan tres condiciones:

- Las soluciones D den resultado negativo
- Las soluciones B den resultado positivo
- La concentración en la solución C se encuentre 0,5 λ y 2 λ.

Para calcular la concentración de endotoxina de A, se calculará la concentración punto final para cada réplica, multiplicando cada dilución por λ. La concentración de endotoxina en la solución de ensayo es la concentración punto final de las réplicas. Es decir, si hallamos la concentración a una determinada dilución, la multiplicaremos por la dilución a la que ha sido sometida para hallar la concentración real.

Si ninguna solución da positiva la concentración de endotoxina es menor de λ. Si todas las diluciones son positivas, la concentración es igual o mayor que la dilución más alta multiplicada por λ.

La preparación examinada cumple los requisitos del ensayo si la concentración de endotoxina en ambas réplicas es menor que la especificada en la monografía.

## **CONCLUSIÓN**

Como hemos podido observar, los requerimientos para que un producto o sustancia cumpla con los estándares de calidad microbiológica siguen unas directrices claras especificadas en la farmacopea europea; a su vez estas directrices nos sirven para proteger a la población mundial de multitud de microorganismos y sus toxinas, que sin ellas producirían grandes problemas de salud.

En este trabajo solo observamos una breve pincelada de todo lo que conforma la calidad dentro de la industria farmacéutica, pero gracias a esa calidad, y a muchas otras cosas, podemos decir que la industria farmacéutica es una empresa fiable a nivel de seguridad sanitaria y en gestión de calidad.

## **BIBLIOGRAFÍA**

### **Farmacopea Europea. 10ª edición, 2020. Dirección Europea de Calidad de Medicamentos (Estrasburgo), Consejo de Europa:**

- II. Introducción. Pág. V - VIII.
- 5.1.4. Calidad microbiológica en preparaciones farmacéuticas no estériles. Pág. 6473-6474.
- 5.1.9. Guías para usar los ensayos de esterilidad. Farmacopea Europea. Pág. 592 - 593
- 5.1.10. Guías para usar los ensayos de endotoxinas bacterianas. Pág. 593 - 596
- 2.6.14. Endotoxinas bacterianas. Pág. 4707 - 4711
- 2.6.1. Esterilidad. Pág. 185 -188
- 2.6.12. Examen microbiológico de productos no estériles: enumeración de ensayos microbiológicos. Pág. 195 - 199
- 2.6.13. Examen microbiológico de productos no estériles: ensayos para microorganismos específicos. Pág. 199 - 204