

FARMACOPEIA MERCOSUL: ENSAIO DE ESTERILIDADE

TENDO EM VISTA: O Tratado de Assunção, o Protocolo de Ouro Preto e as Resoluções Nº 31/11 e 22/14 do Grupo Mercado Comum.

CONSIDERANDO:

Que a Farmacopeia MERCOSUL tem como objetivo estabelecer requisitos mínimos de qualidade e segurança dos insumos para a saúde, especialmente dos medicamentos, apoiando as ações de regulação sanitária e promovendo o desenvolvimento técnico, científico e tecnológico regional.

Que as especificações farmacopeicas estabelecem, por meio de monografias, requisitos mínimos para o controle de segurança e qualidade dos insumos, especialidades farmacêuticas, plantas medicinais e derivados produzidos ou utilizados nos Estados Partes.

Que as especificações farmacopeicas são utilizadas como parâmetro para as ações de vigilância sanitária, incluindo o registro de medicamentos, inspeções e análises laboratoriais.

Que a Farmacopeia MERCOSUL e a produção de padrões próprios de qualidade favorecem o desenvolvimento científico e tecnológico dos Estados Partes, contribuindo para a diminuição da dependência de fornecedores estrangeiros e promovendo a indústria regional.

Que a Farmacopeia MERCOSUL deve ser primordialmente sanitária, com foco na saúde pública, e apresentar uma metodologia analítica acessível aos Estados Partes, buscando seu reconhecimento e respeitabilidade internacional.

Que o diálogo regulatório e a integração entre os Estados Partes promovem o acesso da população a medicamentos com maior qualidade e segurança.

Que o Acordo Nº 08/11 da Reunião de Ministros de Saúde do MERCOSUL constitui um marco de referência para a Farmacopeia MERCOSUL.

**O GRUPO MERCADO COMUM
RESOLVE:**

Art. 1º - Aprovar, no marco do estabelecido na Resolução GMC Nº 22/14, o método geral "Farmacopeia MERCOSUL: Ensaio de Esterilidade", que consta como Anexo e faz parte da presente Resolução.

Art. 2º - Os Estados Partes indicarão, no âmbito do SGT Nº 11, os organismos nacionais competentes para a implementação da presente Resolução.

Art. 3º - Esta Resolução deverá ser incorporada ao ordenamento jurídico dos Estados Partes antes de...

XLV SGT N° 11 – Montevideo, 14/IV/16.

ANEXO

ENSAIO DE ESTERILIDADE

O seguinte ensaio se aplica para verificar a ausência de contaminação por micro-organismos (bactérias e fungos) em amostras de produtos esterilizados ou preparados assepticamente.

A ausência de contaminação microbiana, evidenciada por este procedimento, confirma que o produto cumpre com os requisitos do ensaio. Contudo, o mesmo não é suficiente para garantir a esterilidade da totalidade do lote ensaiado, dadas as limitações inerentes à estatística de amostragem. A condição de estéril é assegurada por meio da validação do processo de esterilização ou do processamento asséptico.

Precauções contra a contaminação microbiana

O ensaio de esterilidade é realizado sob condições assépticas, de modo que, para se conseguir tais condições, o ambiente onde se realiza o ensaio deve ser adaptado de modo adequado. As precauções para evitar a contaminação devem ser tomadas para que nenhum microrganismo a ser detectado neste ensaio seja afetado. As condições de trabalho são monitoradas regularmente por amostragem adequada da área de trabalho e realização de controles apropriados.

Meios de cultivo e temperaturas de incubação

Os meios para o ensaio podem ser preparados como descritos a seguir ou podem ser utilizados meios equivalentes disponíveis comercialmente, os quais devem cumprir com os requisitos do *Ensaio de promoção de crescimento de Micro-organismos Aeróbios, Anaeróbios e Fungos*.

Os meios de cultura descritos a seguir são adequados para o ensaio de esterilidade. O *Meio Líquido de tioglicolato* é utilizado primariamente para o cultivo de bactérias anaeróbicas, embora também possa detectar o crescimento de bactérias aeróbicas.

O *Caldo de Caseína Soja* é adequado para a cultura tanto de fungos quanto de bactérias aeróbicas.

Meio Líquido de Tioglicolato

L-Cistina	0,5 g
Cloreto de sódio	2,5 g
Dextrose monoidratada/anidra	5,5/5,0 g
Ágar	0,75g
Extrato de levedura (solúvel em água)	5,0 g
Caseína de digestão pancreática	15,0 g
Tioglicolato de sódio	0,5 g
Ácido tioglicólico	0,3 mL
Resazurina sódica (1 em 1000) recentemente preparada	1,0 mL

Água purificada	1000 mL
pH do meio após esterilização	7,1 ± 0,2

Misturar L-cistina, ágar, cloreto de sódio, dextrose, extrato de levedura e caseína de digestão pancreática com água purificada e aquecer até dissolução total. Dissolver o tioglicolato de sódio ou ácido tioglicólico nessa solução e, se necessário, adicionar hidróxido de sódio 1 N de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de 7,1 ± 0,2. Se houver necessidade de filtração, aquecer a solução novamente, sem deixar alcançar a ebulição e filtrar, ainda quente, em papel de filtro umedecido. Adicionar a solução de resazurina sódica, misturar e distribuir em frascos adequados de forma que a relação entre superfície e profundidade seja tal que não mais que a metade superior do meio tenha sofrido uma mudança de cor indicativa de captação de oxigênio ao final do período de incubação.

Esterilizar utilizando processo validado. Se não for utilizar o meio imediatamente, estocar em temperatura entre 2°C e 25°C em um recipiente estéril e hermético. Se uma porção maior que o terço superior do meio tenha adquirido a cor rosada, o meio pode ser recuperado esquentando os recipientes em banho-maria ou em vapor fluente até que a cor rosada desapareça. Esfriar rapidamente evitando a entrada de ar não estéril no recipiente. Não utilizar o meio por um período de estocagem superior àquele para o qual ele foi validado.

O *Meio líquido de tioglicolato* deve ser incubado a 30°C-35°C. Para produtos que contêm um conservante mercurial e que não pode ser analisado pelo método de filtração por membrana, pode ser utilizado o *Meio Líquido de Tioglicolato* incubado a 20°C-25°C em substituição ao *Caldo de caseína soja*, quando for validado conforme *Ensaio de promoção de crescimento de Micro-organismos Aeróbios, Anaeróbios e Fungos*.

É possível a utilização de um meio de tioglicolato alternativo nos casos em que seja prescrito ou desde que justificado e autorizado. Preparar uma mistura que possua a mesma composição do *Meio líquido de tioglicolato*, mas sem ágar e solução de resazurina sódica. Esterilizar conforme indicado anteriormente. O pH após esterilização é 7,1 ± 0,2. Aquecer em banho-maria antes de utilizar e incubar a 30°C-35°C sob condições anaeróbicas.

Caldo de caseína soja

Caseína de digestão pancreática	17,0 g
Farinha de soja de digestão papaínica	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
Dextrose monoidratada/anidra	2,5/2,3 g
Água purificada	1000 mL
pH do meio após esterilização	7,3 ± 0,2

Dissolver todos os componentes em água purificada, aquecendo brandamente até completar a dissolução. Resfriar à temperatura ambiente e ajustar o pH com hidróxido de sódio 1 N de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de $7,3 \pm 0,2$. Filtrar o meio, se necessário, para alcançar uma solução transparente, distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando um processo validado.

Armazenar à temperatura entre 2 °C e 25 °C em um frasco estéril e bem fechado, a menos que se utilize imediatamente. Não utilizar o meio por um período de estocagem superior àquele para o qual ele foi validado. O *Caldo de caseína soja* deve ser incubado a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

Meios para Penicilinas ou Cefalosporinas

Quando for necessário utilizar meios de ensaio de esterilidade no método de *Inoculação Direta do Meio de Cultivo*, indicado no *Ensaio de Esterilidade do Produto a Examinar*, modificar a preparação do *Meio Líquido de Tioglicolato* e do *Caldo de Caseína Soja* segundo descrito a seguir. Transferir assepticamente aos recipientes de cada meio uma quantidade de β -lactamase suficiente para inativar a quantidade de antibiótico presente na amostra de ensaio. Determinar a quantidade de β -lactamase requerida para inativar o antibiótico, utilizando uma preparação de β -lactamase cujo poder inativante de penicilinas ou cefalosporinas tenha sido dosado previamente.

Os meios complementados com β -lactamase também podem ser utilizados no ensaio de filtração por membrana.

Alternativamente, (em um local completamente separado daquele usado para os ensaios de esterilidade), confirmar se foi adicionada uma quantidade adequada de β -lactamase no meio, seguindo um dos métodos indicados em *Ensaio de Adequabilidade do Método*. Utilizar como desafio menos de 100 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Staphylococcus aureus* (ver Tabela 1). Deve ser observado um crescimento microbiano típico do cultivo inoculado como confirmação de que a concentração de β -lactamase é adequada.

Tabela 1. Cepas de Micro-organismos de Ensaio Adequados para Usar no Ensaio de Promoção de Crescimento e no Ensaio de Adequabilidade do Método

Meio	Micro-organismo	Cepa
Meio líquido de tioglicolato	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCTC 10788, NCIMB 9518, CIP 4.83, NBRC 13276
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275, INCQS 00230
	<i>Clostridium sporogenes</i> *	ATCC 19404, NCTC 532, CIP 79.3, INCQS 00352 ou ATCC 11437, NCIMB 14239, CIP 100651, NBRC 14293

Alternativo do tioglicolato	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, NCTC 532, CIP 79.3, ATCC 11437, NCIMB 14293, NBRC 14293
Caldo de caseína soja	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, NBRC 3134
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, NBRC 1594
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83, NBRC 9455

Um micro-organismo alternativo para *Pseudomonas aeruginosa* é a *Kocuria rhizophila* (*Micrococcus luteus*) ATCC 9341.

Uma alternativa a *Clostridium sporogenes*, quando se desejar utilizar um micro-organismo não formador de esporos, é *Bacteróides vulgatus* (ATCC 8482).

Uma alternativa a *Staphylococcus aureus* é o *Bacillus subtilis* (ATCC 6633, CIP 52.62, NBRC 3134, NCIMB 8054, NCTC 10400).

Os meios utilizados cumprem com os ensaios a seguir, realizados antes ou de forma paralela com o ensaio do produto a examinar.

Esterilidade: Incubar porções do meio por quatorze (14) dias. Não deve ocorrer crescimento microbiano.

Ensaio de Promoção de Crescimento de Micro-organismos Aeróbios, Anaeróbios e Fungos

Avaliar cada lote de meio pronto para utilizar e de meio preparado a partir de meio desidratado ou mistura de ingredientes. As cepas adequadas de micro-organismos estão indicadas na Tabela 1.

Inocular porções de *Meio líquido de tioglicolato* com um número pequeno (não mais que 100 UFC) dos seguintes micro-organismos, utilizando uma porção de meio distinta para cada uma das espécies: *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Inocular porções de *Meio de tioglicolato alternativo* com um número pequeno (não mais que 100 UFC) de *Clostridium sporogenes*. Inocular porções de *Caldo de Caseína Soja* com um número pequeno (não mais que 100 UFC) dos seguintes micro-organismos, utilizando uma porção de meio distinta para cada uma das espécies: *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Incubar por, no máximo, três (3) dias no caso de meios inoculados com bactérias e por, no máximo, cinco (5) dias no caso de meios inoculados com fungos. As técnicas de manutenção de cultivos de lote-semente (sistemas de lote-demente) são utilizadas para que os micro-organismos viáveis empregados na inoculação correspondam a não mais que cinco (5) passagens desde o lote-semente original.

Os meios são considerados adequados se houver evidência de crescimento microbiano.

Líquidos de diluição e lavagem para filtração por membrana

Líquido A: Dissolver 1 g de peptona de carne em água purificada para obter 1 litro, filtrar ou centrifugar para clarificar, se for necessário, e ajustar a um pH de $7,1 \pm 0,2$. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado.

Preparação para penicilinas ou cefalosporinas: adicionar asepticamente à *Preparação* anterior, se for necessário, uma quantidade de β -lactamase estéril suficiente para inativar qualquer atividade residual de antibióticos nas membranas após a filtração da solução da amostra de ensaio (ver *Meios para Penicilinas ou Cefalosporinas*).

Líquido D: adicionar 1 mL de polisorbato 80 por cada litro de *Líquido A*, e ajustar a um pH de $7,1 \pm 0,2$. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado. Utilizar este líquido para amostras que contenham lecitina ou azeite, ou para dispositivos etiquetados "para administração estéril".

Líquido K: dissolver 5,0 g de peptona de carne, 3,0 g de extrato de carne bovina e 10,0 g de polisorbato 80 em água purificada para obter 1 litro. Ajustar o pH para se obter, após a esterilização, um pH de $6,9 \pm 0,2$. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado.

ENSAIO DE ADEQUABILIDADE DO MÉTODO

Para realizar o teste de adequabilidade, proceder conforme descrito em *Ensaio de Esterilidade do Produto a Examinar*, empregando exatamente os mesmos métodos, exceto para as modificações que se seguem.

Filtração por membrana: após a transferência do conteúdo do(s) frasco(s) a ser(em) analisado(s) para o dispositivo de filtração, adicionar um inóculo com um número pequeno de micro-organismos viáveis (não mais que 100 UFC) à última porção do líquido estéril utilizado para lavagem da membrana.

Inoculação Direta: após a transferência do conteúdo do(s) frasco(s) a ser(em) analisado(s) para os frascos contendo os meios de cultura, adicionar um inóculo com um número pequeno de micro-organismos viáveis (não mais que 100 UFC).

Em ambos os casos, utilizar os mesmos micro-organismos já mencionados em *Ensaio de promoção de crescimento de Micro-organismos Aeróbios, Anaeróbios e Fungos*. Realizar um ensaio de promoção de crescimento como controle positivo.

Se o crescimento de micro-organismos obtido após a incubação é visivelmente comparável àquele obtido no controle positivo sem adição de produto, a amostra não apresenta atividade antimicrobiana sob as condições do teste ou tal atividade foi satisfatoriamente eliminada. O teste de esterilidade pode, então, ser conduzido sem necessidade de modificações.

Se não for obtido um crescimento claramente visível na presença da amostra, comparável visualmente com o controle sem o produto, a amostra apresenta atividade antimicrobiana que não foi satisfatoriamente eliminada, sob as condições

do teste. Modificar as condições do teste para eliminar a atividade antimicrobiana e repetir o *Ensaio de adequabilidade do método*. Este ensaio é realizado (a) quando o ensaio de esterilidade deve ser realizado em um produto novo; e (b) sempre que haja modificações nas condições experimentais. O ensaio de adequabilidade do método poderá ser executado simultaneamente com o ensaio de *Esterilidade do Produto a Examinar*.

ENSAIO DE ESTERILIDADE DO PRODUTO A EXAMINAR

Número de unidades a serem avaliadas

A menos que especificado de forma diferente em outra parte deste capítulo ou na monografia individual, testar o número de unidades da amostra especificado na *Tabela 2*. Se as unidades da amostra apresentam conteúdo em quantidade suficiente (ver *Tabela 3*), o conteúdo de cada unidade pode ser dividido em porções iguais para cada tipo de meio de cultura utilizado. [Nota – Realizar os ensaios de esterilidade utilizando dois ou mais meios especificados]. Se as unidades da amostra não apresentam conteúdo em quantidade suficiente para cada meio, utilizar o dobro do número de unidades especificado na *Tabela 3*.

Tabela 2 – Número mínimo de unidades a serem testadas em função do tamanho do lote.

<i>Número de unidades do lote^c</i>	<i>Número mínimo de unidades a serem testadas^{a,b,d}</i>
<i>Preparações parenterais</i>	
Até 100	10% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 100 e até 500	10 unidades
Acima de 500	2% ou 20 unidades (o que for menor)
Parenterais de grande volume	2% ou 10 unidades (o que for menor)
<i>Antibióticos sólidos</i>	
Frascos com capacidade > 5 g	6 unidades
<i>Oftálmicos e outras preparações não injetáveis</i>	
Até 200	5% ou 2 unidades (o que for maior)
Acima de 200	10 unidades
Produto apresentado em embalagem de dose única	Aplicar o mesmo recomendado para preparações parenterais
<i>Produtos para saúde</i>	
Até 100	10% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 100 e até 500	10 unidades
Acima de 500	2% ou 20 unidades (o que for menor)
<i>Produtos sólidos a granel</i>	
Até 4	Cada unidade
Acima de 4 e até 50	20% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 50	2% ou 10 unidades (o que for maior)
<i>Dispositivos médicos cirúrgicos</i>	

Categute e outras suturas	2% ou 5 embalagens (o que for maior) até o máximo de 20 embalagens
Até 100	10% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 100 e até 500	10 unidades

^a amostragem especificada considerando-se que o conteúdo de um recipiente é suficiente para inocular ambos os meios de cultura.

^b para matérias-primas, a amostragem satisfatória pode ser baseada na raiz quadrada do número total de recipientes do lote.

^c Se o tamanho do lote não é conhecido, utilizar o número máximo de unidades indicadas.

^d Se o conteúdo de uma unidade é suficiente para inocular os meios, esta coluna apresenta o número de unidades necessárias para os dois meios juntos.

Tabela 3 – Quantidades mínimas a serem utilizadas para cada meio de cultura.

Quantidade por recipiente	Quantidade mínima a Usar (Exceto que se justifique ou autorize qualquer modificação)
<i>Líquidos</i>	
Menos de 1 mL	todo o conteúdo
1 - 10 mL	metade do conteúdo, mas não menos que 1 mL
Acima de 40 mL e até 100 mL	20 mL
Acima de 100 mL	10% do conteúdo do produto, mas não menos que 20 mL
Líquidos antibióticos	1 mL
Preparações insolúveis, cremes e pomadas a serem suspensos ou emulsificados	conteúdo total, mas não menos que 200 mg
<i>Sólidos</i>	
Menos de 50 mg	conteúdo total
acima de 50 mg e até 300 mg	metade do conteúdo mas não menos que 50 mg
acima de 300 mg e até 5 g	1 a 50 mg
acima de 5 g	500 mg
esparadrapo cirúrgico/gaze/algodão em embalagem	100 mg por envase
suturas e outros materiais em embalagens individuais	todo o material
outros correlatos médicos	todo o material cortado em pedaços ou desmontado

O ensaio pode ser realizado utilizando os métodos de *Filtração em Membrana* ou de *Inoculação Direta*. Controles negativos apropriados devem ser incluídos.

O método de filtração por membrana é utilizado de acordo com a natureza do produto, ou seja, para preparações aquosas filtráveis, preparações alcoólicas ou oleosas e para preparações miscíveis ou solúveis em solventes aquosos ou oleosos, os quais não possuem efeito antimicrobiano nas condições de ensaio.

Filtração por Membrana

Utilizar membranas filtrantes com porosidade nominal não superior a 0,45 µm cuja eficiência em reter micro-organismos tenha sido estabelecida. Filtros de nitrato de celulose, por exemplo, são utilizados para soluções aquosas, oleosas e fracamente alcoólicas e filtros de acetato de celulose, por exemplo, para soluções fortemente alcoólicas. Filtros especialmente adaptados podem ser requeridos para determinados produtos, como antibióticos. Os procedimentos descritos a seguir aplicam-se a membranas com diâmetro de aproximadamente 50 mm. Se filtros com diâmetros diferentes são utilizados, os volumes das diluições e lavagens devem ser ajustados conforme o diâmetro da membrana empregada. O dispositivo de filtração e a membrana são esterilizados por processo adequado. O dispositivo apresenta configuração tal que a solução a ser examinada pode ser introduzida e filtrada sob condições assépticas: permite a remoção asséptica da membrana para sua transferência ao meio de cultura ou é adequado para proceder à incubação após adição do meio de cultura ao próprio dispositivo.

Soluções aquosas

Quando corresponder, transferir pequena quantidade de diluente estéril, como o *Líquido A* (ver *Líquidos de Diluição e Lavagem para Filtração por Membrana*), para a membrana e filtrar. O diluente pode conter substâncias neutralizantes e/ou inativantes adequadas, como no caso de antibióticos.

Transferir para a(s) membrana(s) o conteúdo do(s) recipiente(s) a ser(em) testado(s) depois de diluí-lo até o volume utilizado no *Ensaio de Adequabilidade do Método*, porém em quantidades não inferiores às recomendadas nas *Tabelas 2 e 3*. Filtrar imediatamente. Se o produto apresentar atividade antimicrobiana, lavar a membrana, no mínimo, três vezes filtrando, a cada vez, o volume do diluente estéril estabelecido no *Ensaio de Adequabilidade do Método*. O ciclo de lavagem não deve exceder cinco lavagens por filtro com 200 mL cada uma, mesmo se durante o teste de validação tenha sido demonstrado que tal ciclo de lavagens não elimina completamente a atividade antimicrobiana. Transferir a membrana inteira para o meio de cultivo ou cortá-la assepticamente em duas partes iguais e transferir cada metade para os meios adequados. Usar o mesmo volume de cada meio, já definido no *Ensaio de Adequabilidade do Método*. Alternativamente, transferir o meio para a membrana de dispositivos de filtração fechados. Incubar os meios por pelo menos quatorze (14) dias.

Sólidos solúveis

Utilizar, para cada meio de cultura, não menos do que a quantidade de amostra

especificada nas *Tabelas 2 e 3*, dissolvida em solvente adequado, como, por exemplo, o solvente fornecido com a preparação, água para injetáveis, solução salina estéril ou uma solução estéril adequada como o *Líquido A* (ver *Líquidos de Diluição e Lavagem para Filtração por Membrana*), e prosseguir com o ensaio conforme indicado anteriormente para *Soluções Aquosas*, utilizando uma membrana adequada para o solvente escolhido.

Óleos e soluções oleosas

Utilizar para cada meio de cultura não menos que a quantidade de amostra especificada nas *Tabelas 2 e 3*. Óleos e soluções oleosas de baixa viscosidade podem ser filtradas sem diluição através da membrana seca. Óleos viscosos podem ser diluídos, se necessário, em solvente estéril adequado como, por exemplo, miristato de isopropila, desde que demonstrado não possuir atividade antimicrobiana nas condições do teste. Deixar o óleo penetrar na membrana por seu próprio peso e na sequencia filtrar utilizando pressão ou sucção gradualmente. Lavar a membrana pelo menos três vezes filtrando, a cada vez, aproximadamente 100 mL de uma solução estéril adequada como, por exemplo, o *Líquido A* (ver *Líquidos de Diluição e Lavagem para Filtração por Membrana*), que contenha um agente emulsificante adequado a uma concentração que tenha demonstrado ser apropriada no *Ensaio de Adequabilidade do Método*, como por exemplo polisorbato 80 a uma concentração de 10 g/L (*Líquido K*). Transferir a(s) membrana(s) para o meio de cultura, ou vice-versa, e prosseguir o ensaio conforme descrito para *Soluções Aquosas*.

Pomadas e Cremes

Utilizar, para cada meio de cultura, quantidade de amostra especificada nas *Tabelas 2 e 3*. Pomadas de base oleosa e emulsões do tipo água em óleo podem ser diluídas para 1% em miristato de isopropila como descrito anteriormente, aquecendo, se necessário, a no máximo 40 °C. Em casos excepcionais, aquecer no máximo até 44 °C. Filtrar, o mais rapidamente possível, e prosseguir conforme descrito em *Óleos e soluções oleosas*.

Seringas já preenchidas

Para seringas já preenchidas sem agulhas estéreis acopladas, expelir o conteúdo de cada seringa diretamente sobre a(s) membrana(s) – uma ou duas - ou em frascos separados antes da transferência. Se for adicionada uma agulha estéril, expelir diretamente o conteúdo da seringa como já descrito e prosseguir o ensaio conforme descrito para *Soluções Aquosas*. Avaliar a esterilidade da agulha conforme o procedimento de *Inoculação Direta*, indicado no *Ensaio de Adequabilidade do Método*.

Sólidos para injeção distintos de antibióticos

Reconstituir o produto segundo as instruções do rótulo e prosseguir o ensaio conforme descrito para *Soluções Aquosas ou Óleos e Soluções Oleosas*. [Nota—Se for necessário, pode ser adicionado um excesso de diluente para facilitar a reconstituição e filtração do produto reconstituído.

Antibióticos sólidos, granéis e misturas

Retirar assepticamente uma quantidade suficiente de sólido da quantidade adequada de unidades envasadas (ver *Tabela 2*), homogeneizar até se obter uma mistura equivalente a cerca de 6 g de sólido e transferir para um Erlenmeyer estéril de 500 mL. Dissolver em aproximadamente 200 mL de *Líquido A* e misturar. Prosseguir o ensaio conforme descrito para *Soluções Aquosas*.

Aerossóis Estéreis

Para produtos líquidos pressurizados, congelar em mistura de etanol e gelo seco a pelo menos -20 °C, por aproximadamente 1 hora. Se possível, deixar o propelente escapar antes de abrir assepticamente a embalagem e transferir o conteúdo para frasco adequado estéril.

Adicionar 100 mL de *Líquido D* ao frasco estéril e homogeneizar suavemente. Prosseguir conforme descrito para *Soluções Aquosas* ou *Óleos e Soluções Oleosas*, conforme o caso.

Dispositivos com guias estéreis

Passar assepticamente um volume de *Líquido D* não inferior a 10 vezes o volume das guias através de cada dispositivo analisado. Recolher o fluido em um recipiente adequado estéril e proceder conforme indicado para *Soluções Aquosas* ou *Óleos e Soluções Oleosas*, conforme o caso. No caso das seringas vazias estéreis, extrair o diluente estéril do recipiente através da agulha estéril, se estiver acoplada, ou através de uma agulha estéril acoplada para proceder ao ensaio, e expulsar o conteúdo em um recipiente estéril. Proceder como indicado anteriormente.

INOCULAÇÃO DIRETA DO MEIO DE CULTIVO

Transferir diretamente para os meios de cultura a quantidade do produto especificada nas *Tabelas 2 e 3*, de tal forma que o volume do produto não seja maior que 10% do volume do meio de cultura, a menos que especificado de maneira diferente.

Se a amostra apresentar atividade antimicrobiana, realizar o teste após a neutralização da atividade com uma substância neutralizante adequada ou por diluição em quantidade suficiente de meio de cultura. Quando for necessário o uso de grandes volumes do produto, pode-se trabalhar com meio de cultura concentrado, preparado levando-se em conta a diluição subsequente. Quando apropriado, o meio concentrado pode ser adicionado diretamente à amostra em seu recipiente.

Líquidos oleosos

Utilizar meio de cultura contendo agente emulsificante apropriado em concentração que tenha se mostrado adequada no *Ensaio de Adequabilidade do Método*, por exemplo, polissorbato 80 a uma concentração de 10 g por L.

Pomadas e Cremes

Realizar uma diluição de aproximadamente 1 para 10, utilizando um agente emulsificante adequado adicionado a um diluente estéril como, por exemplo, o *Líquido A* (ver *Líquidos de diluição e lavagem para filtração por membrana*). Transferir a amostra diluída para meios de cultura sem emulsificante.

Incubar os meios inoculados por, no mínimo, quatorze (14) dias. Observar os meios várias vezes durante o período de incubação. Agitar, suavemente, os frascos de meio de cultura que contenham produtos oleosos todos os dias. Contudo, quando for utilizado o *Meio líquido de tioglicolato* para detectar micro-organismos anaeróbios, agitar ou misturar minimamente de forma a manter as condições anaeróbicas.

Sólidos

Transferir uma quantidade de amostra na forma de sólido seco (ou preparar uma suspensão do produto adicionando diluente estéril ao recipiente) correspondente a não menos que a quantidade especificada nas *Tabelas 2 e 3*. Transferir o material assim obtido para 200 mL de *Meio líquido de tioglicolato* e misturar. Do mesmo modo, transferir a mesma quantidade do material para 200 mL de *Caldo de caseína soja* e misturar. Prosseguir conforme indicado anteriormente.

Algodão purificado, gaze, bandagem e material relacionado

De cada embalagem de algodão, gaze em rolo ou gaze em bandagem a ser analisada, retirar assepticamente duas ou mais porções de 100 a 500 g das partes mais internas da amostra. Para materiais de uso único em embalagem individual, extrair assepticamente toda a unidade. Submergir as porções ou a unidade em cada meio de cultura e proceder conforme indicado anteriormente.

Dispositivos estéreis

Os dispositivos podem ser imersos inteiros ou desmontados. Para assegurar que todas as partes do dispositivo estejam em contato com os meios, submergir a quantidade adequada de unidades em um volume de meio suficiente para a imersão completa do dispositivo e proceder conforme indicado anteriormente. Para aparelhos muito grandes, fazer a imersão de partes que entrem em contato com o paciente em volume de meio suficiente para a imersão completa dessas partes.

Para cateteres cujos lúmens, interno e externo, devam ser estéreis, cortá-los em pedaços de modo que o meio entre em contato com todo o lúmen ou preencher o lúmen com o meio e promover a imersão do aparelho inteiro.

OBSERVAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Durante o período de incubação e até o seu término, examinar os meios em busca de evidências macroscópicas de crescimento microbiano. Se a amostra sob exame provoca turvação dos meios de cultura, de modo que não seja possível determinar facilmente a presença ou ausência de crescimento microbiano mediante análise

visual, transferir porções adequadas do meio (não menos que 1 mL cada uma) quatorze (14) dias após o início da incubação para frascos novos dos mesmos meios e, em seguida, incubar os frascos originais e os frascos novos por pelo menos quatro (4) dias.

Se não houver evidências de crescimento microbiano, a amostra sob exame cumpre com o ensaio de esterilidade. Se for evidenciado crescimento de micro-organismos, a amostra não cumpre com o ensaio de esterilidade, a não ser que se possa demonstrar claramente que o ensaio é inválido por razões não relacionadas com o produto analisado. O teste de esterilidade pode ser considerado inválido se uma ou mais das seguintes condições forem observadas:

- os dados de monitoramento microbiológico da área de realização do teste demonstram falha;
- uma revisão dos procedimentos analíticos utilizados durante o teste revela falha;
- se crescimento microbiano for observado nos controles negativos;
- após a identificação do micro-organismo(s) isolado(s) a partir do teste, o crescimento dessa(s) espécie(s) pode ser atribuído, inequivocadamente, a falhas relacionadas ao material utilizado ou à técnica utilizada na execução do teste de esterilidade.

Se for considerado inválido, o teste de esterilidade deve ser repetido com o mesmo número de unidades do teste inicial. Se, após a repetição do teste, não for observado crescimento microbiano, a amostra cumpre com o ensaio de esterilidade. Se for observado crescimento microbiano após a repetição do teste, a amostra sob exame não cumpre com o ensaio de esterilidade.

Aplicação do ensaio a preparações parenterais, oftálmicas e outras preparações não-injetáveis com requerimento para esterilidade

Ao empregar a técnica de filtração por membrana, utilizar, sempre que possível, todo o conteúdo do recipiente, mas não menos que a quantidade indicada nas *Tabelas 2 e 3*, diluindo, quando necessário, para aproximadamente 100 mL com uma solução estéril adequada, como o *Líquido A* (ver *Líquidos de diluição e lavagem para filtração por membrana*).

Ao empregar a técnica de inoculação direta, utilizar as quantidades indicadas na *Tabela 2*, a menos que outra forma seja autorizada e justificada. Os testes para bactérias e fungos são realizados com uma mesma unidade da amostra sob exame. Quando o volume ou a quantidade em um único recipiente é insuficiente para a realização do teste, os conteúdos de dois ou mais recipientes são utilizados para inocular os diferentes meios.

Número mínimo de unidades a serem avaliadas

A *Tabela 3* indica o número mínimo de unidades a serem avaliadas em relação ao tamanho do lote.