

FARMACOPEIA MERCOSUL: MÉTODO GERAL 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, a monografia "Farmacopeia MERCOSUL: "Método Geral 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...

XLIII SGT Nº 11 – Brasília, 10/IV/15.

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 através 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 qualquer microrganismo a ser detectado neste ensaio não 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 utilizados para testes de esterilidade são o *Meio líquido de tioglicolato* e o *Caldo de caseína soja*. O primeiro é utilizado primariamente para cultura de bactérias anaeróbicas, embora, também, possa detectar o crescimento de bactérias aeróbicas. O segundo é adequado para a cultura de leveduras, fungos e bactérias aeróbicas. Os meios utilizados devem cumprir com os requisitos do *Ensaio de promoção de crescimento de Micro-organismos Aeróbios, Anaeróbios e Fungos*.

Meio Líquido de Tioglicolato

L-Cistina	0,5 g
Cloreto de sódio	2,5 g
Dextrose	5,5g
Ágar granulado (umidade não superior a 15%)	0,75g
Extrato de levedura (solúvel em água)	5,0 g
Caseína de digestão pancreática	15,0 g
Tioglicolato de sódio (ou ácido tioglicólico)	0,5 g (0,3 ml)
Resazurina sódica a 0,1% (p/v) recentemente preparada	1,0 ml
Água purificada	1000 ml
pH do meio após esterilização	7,1 ± 0,2

Misturar a L-cistina, cloreto de sódio, dextrose, extrato de levedura e caseína de digestão pancreática com 1000 mL de água purificada e aquecer até dissolução

total. Dissolver o tioglicolato de sódio ou ácido tioglicólico nessa solução e ajustar o pH com hidróxido de sódio *M* de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de $7,1 \pm 0,2$. Se houver necessidade de filtração, aquecer a solução novamente, sem deixar alcançar a ebulição e filtrar, ainda quente, em papel de filtro. Adicionar a solução de resazurina sódica, misturar e distribuir em frascos adequados. O meio deve apresentar uma coloração rósea na sua superfície que não exceda um terço da altura da sua massa líquida. No caso de se obter um meio com coloração rósea em mais de um terço de sua massa líquida, restaurar o meio por um único aquecimento em banho-maria ou em vapor fluyente.

Esterilizar utilizando processo validado. Se não for utilizar imediatamente, estocar em temperatura entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ conforme orientação do fabricante. 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 contem um conservante mercurial e que não pode ser analisado pelo método de filtração por membrana, utilizar *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*.

Desde que justificado e autorizado, é possível a utilização de um meio de tioglicolato alternativo. Proceder conforme descrito para *Meio líquido de tioglicolato* sem a adição do ágar e da resazurina sódica. O pH após esterilização é $7,1 \pm 0,2$. O Meio alternativo do *Meio líquido de tioglicolato* deve ser incubado a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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	2,5 g
Água purificada	1000 mL
pH do meio após esterilização	$7,3 \pm 0,2$

Dissolver todos os componentes em água purificada, aquecendo brandamente. Resfriar à temperatura ambiente e ajustar o pH com hidróxido de sódio *M* de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de $7,3 \pm 0,2$. Se necessário, filtrar para clarificação do meio. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado. Se não for utilizar imediatamente, estocar em temperatura entre $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} + 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob condições aeróbicas.

Meios para Penicilinas o Cefalosporinas

Quando for necessário usar meios de ensaio de esterilidade no método de *Inoculação Direta do Meio de Cultivo* que se indica em *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 que 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.

Confirmar a esterilidade de cada lote de meio esterilizado incubando todos os frascos dos meios nas condições especificadas por 14 dias. Não deve ocorrer crescimento microbiano.

A ocorrência de crescimento microbiano inutiliza o lote de meio para o teste de esterilidade.

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

Cada lote de meio de cultura esterilizado deve ser testado quanto à sua capacidade em promover o crescimento de micro-organismos. Inocular, separadamente, tubos de cada meio com volume de inóculo contendo não mais que 100 UFC de cada cepa microbiana listada na Tabela 1 e incubar conforme as condições especificadas para cada meio. O teste de promoção de crescimento é considerado válido se houver evidência de crescimento microbiano, visualizado pela turvação e/ou por métodos microscópicos, após 3 dias de incubação dos meios inoculados com bactérias e após 5 dias de incubação dos meios inoculados com fungos.

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.

Bacteróides vulgatus (ATCC 8482) pode ser utilizado alternativamente a *Clostridium sporogenes*, quando não for necessário o uso de um micro-organismo não formador de esporos.

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

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 o cefalosporinas: adicionar assepticamente 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 o 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. Usar 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 transferência do conteúdo do(s) frasco (s) a ser (em) analisado (s) para o dispositivo de filtração, adicionar não mais que 100 UFC dos micro-organismos viáveis à última porção do líquido estéril utilizado para lavagem da membrana.

Inoculação Direta: Após transferência do conteúdo do(s) frasco(s) a ser(em) analisado (s) para frascos contendo os meios de cultura, adicionar não mais que 100

UFC dos micro-organismos viáveis aos meios.

En ambos casos, usar os mesmos micro-organismos já mencionados em *Ensaio de promoção de crescimento de Micro-organismos Aeróbios, Anaeróbios e Fungos*. Realizar un 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 o crescimento de micro-organismos não é obtido na presença da amostra, ou se ele não é visivelmente comparável àquele obtido nos controles positivos, a amostra apresenta atividade antimicrobiana que não foi satisfatoriamente eliminada, sob as condições do teste.

Nesse caso, devem ser feitas modificações nas condições do teste para eliminar a atividade antimicrobiana, tais como diluição, uso de substâncias neutralizantes, aumento do número de lavagens no método de filtração em membrana ou uma combinação delas. O teste de validação deve ser repetido para verificar se a atividade antimicrobiana foi eliminada pela modificação proposta.

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 na monografia individual, testar o número de unidades da amostra especificado na *Tabela 2*. Se as unidades da amostra apresentam conteúdo em quantidade suficiente (*Tabela 3*), o conteúdo de cada unidade pode ser dividido em duas porções iguais para cada tipo de meio de cultura utilizado. Se as unidades da amostra não apresentam conteúdo em quantidade suficiente para cada meio, separar o dobro do número de unidades especificado na *Tabela 2* para realização do teste.

O teste de esterilidade pode ser realizado utilizando os métodos de *Filtração em Membrana* ou de *Inoculação Direta*. Em ambos os casos, 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.

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

Número de unidades do lote	Número mínimo de unidades a serem testadas^{a,b}
<i>Preparações parenterais</i>	
Até 100	10% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 100 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	20 unidades
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 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 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 até 500	10 unidades
Acima de 500	2% ou 20 unidades (o que for maior)

^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.

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 até 100 mL	20 mL
Acima de 100 mL	10% do conteúdo do produto, mas não menos que 20 mL
Líquidos antibioticos	1 mL
Outras preparações solúveis em água ou em solvente do tipo miristato de isopropila	conteúdo total, mas não menos que 0,2 g

Cremes e pomadas insolúveis a serem suspensos ou emulsificados	conteúdo total, mas não menos que 0,2 g
<i>Sólidos</i>	
Menos de 50 mg	conteúdo total
acima de 50 mg até 300 mg	metade do conteúdo mas não menos que 50 mg
acima de 300 mg até 5 g	1 a 50 mg
acima de 5 g	500 mg
esparadrapo cirúrgico/gaze/algodão em embalagem múltipla	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

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. O dispositivo de filtração deve possibilitar, ainda, a remoção asséptica da membrana para sua transferência ao meio de cultura ou ser adequado para proceder à incubação após adição do meio de cultura ao próprio dispositivo.

Soluções aquosas

Transferir pequena quantidade de diluente estéril, como o *Líquido A* (ver *Líquidos de Diluição e Lavagem para Filtración por Membrana*), para a membrana e filtrar. O diluente pode conter substâncias neutralizantes e ou inativantes, como no caso de antibióticos. Transferir para a membrana os conteúdos dos recipientes a serem testados ou a diluição apropriada (previamente definida no *Ensaio de Adequabilidade do Método*) em quantidades não inferiores àquelas recomendadas nas *Tabelas 2 e 3* e 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*. A quantidade de líquido de lavagem utilizada não deve ser superior a cinco porções de 200 mL, 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 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 fechados. Incubar os meios por pelo menos 14 dias.

Sólidos solúveis

Utilizar, para cada meio de cultura, quantidade de amostra especificada nas *Tabelas 2 e 3*. Dissolver o produto em fluido adequado, como o *Líquido A* (ver *Líquidos de Diluição e Lavagem para Filtração por Membrana*), e prosseguir conforme *Soluções Aquosas*.

Óleos e soluções oleosas

Utilizar, para cada meio de cultura 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 devem ser diluídos 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, filtrar utilizando vácuo gradualmente. Lavar a membrana com, no mínimo, três porções do *Líquido A* (ver *Líquidos de Diluição e Lavagem para Filtração por Membrana*), que contenha um agente emulsionante adequado a uma concentração apropriada demonstrada no *Ensaio de Adequabilidade do Método*, como por exemplo polisorbato 80 a uma concentração de 10 g/L (*Líquido K*). 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 solvente adequado (miristato de isopropila, ou outro) como descrito no item anterior, aquecendo, se necessário, a 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 acopladas, expelir o conteúdo de cada seringa diretamente sobre a (s) membrana (s) ou em frascos separados e depois filtrar. Se é adicionada uma agulha estéril, expelir diretamente o conteúdo como já descrito. Prosseguir o ensaio conforme descrito para *Soluções Aquosas*.

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 durante o ensaio.]

Antibióticos sólidos, granéis e misturas

Retirar assepticamente uma quantidade suficiente de sólido da quantidade de unidades envasadas (*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 o conteúdo em mistura de etanol e gelo seco a pelo menos -20 °C, por aproximadamente 1 hora. Se possível, antes da abertura da embalagem, deixar o propelente escapar e transferir assepticamente o conteúdo para frasco adequado estéril.

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

Dispositivos estéreis

Passar assepticamente um volume de *Líquido D* não inferior a 10% do volume de cada unidade do total de dispositivos. 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, direta e assepticamente, 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 à adição do produto. Se o recipiente comportar, o meio concentrado pode ser adicionado diretamente à amostra.

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 1% (p/v).

Pomadas e Cremes

Preparar diluição da amostra a 10% utilizando um agente emulsificante adequado adicionado a um diluente estéril como o *Líquido A*. Transferir a amostra diluída para meios de cultura sem emulsificante. Incubar os meios inoculados por, no mínimo, 14

dias. Observar os meios durante todo o período de incubação. Agitar, suavemente, os frascos de meio de cultura contendo óleo, diariamente, durante todo o período de incubação. Os frascos contendo *Meio Líquido de tioglicolato* ou outro meio similar devem ser agitados de forma a não prejudicar as condições de anaerobiose.

Sólidos

Transferir a quantidade de amostra especificada nas *Tabelas 2 e 3* ou preparar uma solução ou suspensão do produto adicionando volume não superior a 20 mL de diluente estéril ao recipiente. Transferir o material assim obtido para 200 mL de *Meio fluido de tioglicolato*. Do mesmo modo, transferir a mesma quantidade do material para 200 mL de *Caldo de caseína soja* e misturar. Prosseguir conforme descrito para *Soluções Líquidas*.

Algodão purificado, gaze, bandagem e material relacionado

De cada embalagem de algodão, gaze em rolo ou gaze em bandagem a ser analisada, retirar, com instrumentos estéreis, duas porções de 0,1 g a 0,5 g das partes mais internas da amostra. Para materiais em embalagem individual, extrair toda a unidade e submergir as porções ou a unidade em cada meio de cultura e proceder conforme indicado em *Soluções Líquidas*.

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. Para aparelhos muito grandes, fazer a imersão de partes que entrem em contato com o paciente em volume de meio suficiente para a imersão de todas as partes. Para cateteres cujos lumens, interno e externo, devam ser estéreis, passar o meio dentro do 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 quanto às evidências macroscópicas de crescimento microbiano. Se a amostra sob exame provoca turvação dos meios de cultura, de modo a impedir a observação do crescimento microbiano, transferir porções adequadas de cada frasco (não menos que 1 mL) para frascos novos dos mesmos meios 14 dias após o início da incubação. Incubar os frascos originais e os frascos novos por um período adicional de não menos que 4 dias. Se, ao final do período de incubação, não houver evidências de crescimento microbiano, a amostra sob exame cumpre com o requisito de esterilidade. Se for evidenciado crescimento de micro-organismos, a amostra não cumpre com o requisito de esterilidade, a não ser que se evidencie falha durante a execução do teste como, por exemplo, contaminação não relacionada com o produto em análise. O teste de esterilidade pode ser considerado inválido se uma ou mais das seguintes condições forem observadas.

- a) os dados de monitoramento microbiológico da área de realização do teste demonstram falha;
- b) uma revisão dos procedimentos analíticos utilizados durante o teste revela falha;

- c) crescimento microbiano é observado nos controles negativos;
- d) após a identificação do micro-organismo(s) isolado(s) a partir do teste, o crescimento dessa espécie(s) pode ser atribuído, inequivocadamente, a falhas relacionadas ao material utilizado e/ou a técnicas utilizadas 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 requisito de esterilidade. Se for observado crescimento microbiano após a repetição do teste, a amostra sob exame não cumpre com o requisito 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*. Ao empregar a técnica de inoculação direta, utilizar as quantidades indicadas nas *Tabelas 2 e 3*, a menos que de outra forma 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.