

**FARMACOPEA MERCOSUR: ENSAYO DE ESTERILIDAD**

**VISTO:** El Tratado de Asunción, el Protocolo de Ouro Preto y las Resoluciones N° 31/11 y 22/14 del Grupo Mercado Común.

**CONSIDERANDO:**

Que la Farmacopea MERCOSUR tiene como objetivo establecer los requisitos mínimos de calidad y seguridad de los insumos para la salud, especialmente de los medicamentos, apoyando las acciones de reglamentación sanitaria y promoviendo el desarrollo técnico, científico y tecnológico regional.

Que las especificaciones farmacopeicas establecen, por medio de monografías, requisitos mínimos para el control de seguridad y calidad de los insumos, especialidades farmacéuticas, plantas medicinales y derivados producidos o utilizados en los Estados Partes.

Que las especificaciones farmacopeicas son utilizadas como parámetro para las acciones de vigilancia sanitaria, incluyendo el registro de medicamentos, inspecciones y análisis de laboratorio.

Que la Farmacopea MERCOSUR y la producción de patrones propios de calidad favorecen al desarrollo científico y tecnológico de los Estados Partes, contribuyendo a la disminución de la dependencia de proveedores extranjeros y promoviendo a la industria regional.

Que la Farmacopea MERCOSUR debe ser primordialmente sanitaria, con énfasis en la salud pública, y presentar una metodología analítica accesible a los Estados Partes, buscando su reconocimiento y respetabilidad internacional.

Que el diálogo regulatorio y la integración entre los Estados Partes promueven el acceso de la población a medicamentos con mayor calidad y seguridad.

Que el Acuerdo N° 08/11 de la Reunión de Ministros de Salud del MERCOSUR constituye un marco de referencia para la Farmacopea MERCOSUR.

**EL GRUPO MERCADO COMÚN  
RESUELVE:**

Art. 1 - Aprobar, en el marco de lo establecido en la Resolución GMC N° 22/14, la resolución "Farmacopea MERCOSUR: Ensayo de Esterilidad", que consta como Anexo y forma parte de la presente Resolución.

Art. 2 - Los Estados Partes indicarán en el ámbito del SGT N° 11 los organismos nacionales competentes para la implementación de la presente Resolución.

Art. 3 - Esta Resolución deberá ser incorporada al ordenamiento jurídico de los Estados Partes antes de...

**XLIII SGT N° 11 – Brasilia, 10/IV/15.**

## ANEXO

### ENSAYO DE ESTERILIDAD

El siguiente ensayo se emplea para verificar la ausencia de contaminación por microorganismos (bacterias y hongos) en muestras de productos esterilizados o preparados asépticamente.

La ausencia de contaminación microbiana, evidenciada por este procedimiento, confirma que el producto cumple con los requisitos del ensayo **aunque** el mismo no es suficiente para suponer la esterilidad de la totalidad del lote ensayado, dadas las limitaciones inherentes a la estadística del muestreo. La condición de estéril se asegura a través de la validación del proceso de esterilización o del procesamiento aséptico.

#### Precauciones contra la contaminación microbiana

El ensayo de esterilidad se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, por lo que, para lograr tales condiciones, el entorno del ensayo debe adaptarse a la manera en que éste se realice. Las precauciones para evitar la contaminación se deben tomar de modo tal que no se afecte a ningún microorganismo que deba detectarse en éste ensayo. Las condiciones de trabajo se monitorean regularmente mediante el muestreo adecuado del área de trabajo y la realización de controles apropiados.

#### Medios de cultivo y temperaturas de incubación

Los medios para el ensayo se pueden preparar según se indica a continuación o se pueden usar medios equivalentes disponibles comercialmente siempre y cuando cumplan con los requisitos del *Ensayo de Promoción del Crecimiento de Organismos Aerobios, Anaerobios y Hongos*.

Se ha hallado que los medios de cultivo siguientes son adecuados para el ensayo de esterilidad. El *Medio Líquido de Tioglicolato* sirve principalmente para el cultivo de bacterias anaerobias. Sin embargo, también detecta bacterias aerobias.

El *Medio de Digerido de Caseína y Soja* es adecuado para el cultivo tanto de hongos como de bacterias aerobias.

#### Medio Líquido de Tioglicolato

L-Cisteína	0,5 g
Cloruro de Sodio	2,5 g
<b>Dextrosa Monohidrato/Anhidra</b>	<b>5,5/5,0 g</b>
<b>Agar</b>	0,75 g
Extracto de Levadura (soluble en agua)	5,0 g
Digerido Pancreático de Caseína	15,0 g
<b>Tioglicolato de Sodio</b>	<b>0,5 g</b>
<b>Acido Tioglicólico</b>	<b>0,3 mL</b>
<b>Solución de Resazurina Sódica (1 en 1000), recién preparada</b>	1,0 mL
Agua Purificada	1000 mL
El pH después de la esterilización	7,1 ± 0,2

Mezclar la L-cisteína, el agar, el cloruro de sodio, la dextrosa, el extracto de levadura y el digerido pancreático de caseína con el agua purificada y calentar hasta su disolución. Disolver el tioglicolato de sodio o el ácido tioglicólico en la solución y de ser necesario agregar hidróxido de sodio 1 N de modo que, después de la esterilización, la solución tenga un pH de  $7,1 \pm 0,2$ . Si se requiere filtración, calentar nuevamente la solución sin llegar a ebullición y filtrar mientras está caliente a través de un papel de filtro humedecido. Agregar la solución de resazurina sódica, mezclar y colocar el medio en recipientes adecuados de forma que la relación entre superficie y profundidad sea tal que no más de la mitad superior del medio haya experimentado un cambio de color indicativo de la captación de oxígeno al final del período de incubación. Esterilizar usando un proceso validado. Si el medio se almacena, mantenerlo a una temperatura entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $25^{\circ}\text{C}$  en un envase estéril y hermético. Si una porción mayor que el tercio superior del medio ha adquirido un color rosado, el medio puede recuperarse una vez calentando los recipientes en un baño de agua o en vapor fluente hasta que desaparezca el color rosado, y enfriar rápidamente tratando de evitar la entrada de aire no estéril en el recipiente. No usar el medio por un periodo de almacenamiento más largo que el que ha sido validado. El Medio Líquido de Tioglicolato debe incubarse a  $30^{\circ}\text{C}$ - $35^{\circ}\text{C}$ . Para productos que contienen un conservante mercurial que no se pueden analizar mediante el método de filtración por membrana, se puede utilizar Medio Líquido de Tioglicolato incubado a  $20^{\circ}\text{C}$ - $25^{\circ}\text{C}$  en lugar de Medio de Digerido de Caseína y Soja, siempre y cuando haya sido validado según se indica en Ensayo de Promoción del Crecimiento de Organismos Aerobios, Anaerobios y Hongos. Es posible utilizar el siguiente medio de tioglicolato alternativo para los casos en que se prescriba o justifique y autorice. Preparar una mezcla que tenga la misma composición que la del Medio Líquido de Tioglicolato, pero omitiendo el agar y la solución de resazurina sódica. Esterilizar según se indica anteriormente. El pH después de la esterilización es  $7,1 \pm 0,2$ . Calentar en un baño de agua antes de usar e incubar a  $30^{\circ}\text{C}$ - $35^{\circ}\text{C}$  bajo condiciones anaeróbicas.

### **Medio de Digerido de Caseína y Soja**

Digerido Pancreático de Caseína	17,0 g
Digerido Papaínico de Harina de Soja	3,0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Fosfato Dibásico de Potasio	2,5 g
Dextrosa Monohidrato/Anhidra	2,5/2,3 g
Agua Purificada	1000 mL
pH después de la esterilización	$7,3 \pm 0,2$

Disolver los sólidos en el Agua Purificada, calentando ligeramente hasta lograr la disolución. Enfriar la solución a temperatura ambiente y ajustar el pH con hidróxido de sodio 1 N de modo que, después de la esterilización, se obtenga un pH de  $7,3 \pm 0,2$ . Filtrar el medio si fuera necesario para lograr una solución transparente, verter en recipientes adecuados y esterilizar usando un procedimiento validado. Almacenar a temperatura entre  $2^{\circ}\text{C}$  y  $25^{\circ}\text{C}$  en un recipiente estéril y bien cerrado, a

menos que se use inmediatamente. No usar el medio por un periodo de almacenamiento más largo que el que ha sido validado. El *Medio de Digerido de Caseína y Soja* debe incubarse a 22,5 °C± 2,5°C.

### Medios para Penicilinas o Cefalosporinas

Cuando deban usarse medios de ensayo de esterilidad en el método de *Inoculación Directa del Medio de Cultivo* que se indica en *Ensayo de Esterilidad del Producto a Examinar*, modificar la preparación del *Medio Líquido de Tioglicolato* y del *Medio de Digerido de Caseína y Soja* según se indica a continuación. Transferir asépticamente a los recipientes de cada medio una cantidad de β -lactamasa suficiente para inactivar la cantidad de antibiótico presente en la muestra de ensayo. Determinar la cantidad de β-lactamasa requerida para inactivar el antibiótico empleando una preparación de β-lacta- masa cuyo poder inactivante de penicilinas o cefalosporinas haya sido valorado previamente.

Los medios complementados con β-lactamasa también pueden usarse en el ensayo de filtración por membrana.

Alternativamente (en un lugar completamente separado del usado para los ensayos de esterilidad), confirmar que se incorpora una cantidad adecuada de β-lactamasa en el medio, siguiendo cualquiera de los dos métodos indicados en *Ensayo de Aptitud del Método*, usando como desafío menos de 100 unidades formadoras de colonias (ufc) de *Staphylococcus aureus* (ver *Tabla 1*). Debe observarse un crecimiento microbiano típico del cultivo inoculado como confirmación de que la concentración de β -lactamasa es adecuada.

**Tabla 1. Cepas de Microorganismos de Ensayo Adecuados para Usar en el Ensayo de Promoción del Crecimiento y en el Ensayo de Aptitud del 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

Un microorganismo alternativo es *Kocuria rhizophila* (*Micrococcus luteus*) ATCC

9341 .

♦<sup>2</sup> Una alternativa para *Clostridium sporogenes*, cuando se desea usar un microorganismo no formador de esporas, es *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482)> Los medios usados cumplen con los ensayos siguientes, realizadas antes o en forma paralela, con el ensayo sobre el producto a examinar.

**Esterilidad:** Incubar porciones del medio durante 14 días. No se produce crecimiento de ningún organismo.

### **Ensayo de Promoción del Crecimiento de Organismos Aerobios, Anaerobios y Hongos**

Evaluar cada lote de medio listo para usar, y de medio preparado ya sea a partir de medio deshidratado o mezclando los ingredientes. Las cepas adecuadas de microorganismos se indican en la *Tabla 1*.

Inocular porciones de *Medio Líquido de Tioglicolato* con un número pequeño (no más de 100 ufc) de los microorganismos siguientes, usando una porción de medio distinta para cada una de las especies: *Clostridium sporogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Inocular porciones de medio de tioglicolato alternativo con un número pequeño (no más de 100 ufc) de *Clostridium sporogenes*. Inocular porciones de *Medio de Digerido de Caseína y Soja* con un número pequeño (no más de 100 ufc) de los microorganismos siguientes, usando una porción de medio distinta para cada una de las especies: *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. Incubar durante no más de 3 días en el caso de bacterias y durante no más de 5 días en el caso de hongos. Las técnicas de mantenimiento de cultivos de lote de siembra (sistemas de lote de siembra) se usan para que los microorganismos viables empleados para la inoculación correspondan a no más de cinco pasajes desde el lote de siembra maestro original.

Los medios son adecuados si se produce un crecimiento claramente visible de los microorganismo

### **Líquidos de dilución y lavado para filtración por membrana**

**Líquido A:** disolver 1 g de peptona de carne en agua purificada para obtener 1 litro, filtrar o centrifugar para clarificar, si fuera necesario, y ajustar a un pH de  $7,1 \pm 0,2$ . Transferir a envases y esterilizar empleando un proceso validado.

**Preparación para penicilinas o cefalosporinas:** agregar asépticamente a la *Preparación* anterior, si fuera necesario, una cantidad de  $\beta$ -lactamasa estéril suficiente para inactivar cualquier actividad residual de antibióticos en las membranas después de haber filtrado la solución de la muestra de ensayo (ver *Medios para Penicilinas o Cefalosporinas*).

**Líquido D:** agregar 1 mL de polisorbato 80 por cada litro de *Líquido A*, y ajustar a un pH de  $7,1 \pm 0,2$ . Transferir a envases y esterilizar empleando un proceso validado. Usar este líquido para artículos que contengan lecitina o aceite, o para dispositivos etiquetados "para administración estéril".

**Líquido K:** disolver 5,0 g de peptona de carne, 3,0 g de extracto de carne bovina y 10,0 g de polisorbato 80 en agua purificada para obtener 1 litro. Ajustar el pH para

obtener, después de la esterilización, un pH de  $6,9 \pm 0,2$ . Transferir a envases y esterilizar empleando un proceso validado.

## **ENSAYO DE APTITUD DEL MÉTODO**

Llevar a cabo el ensayo según se describe más adelante en *Ensayo de Esterilidad del Producto a Examinar* usando exactamente los mismos métodos, a excepción de las modificaciones siguientes.

**Filtración por membrana:** después de transferir a la membrana el contenido del envase o envases a analizar, agregar un inóculo de un número pequeño de microorganismos viables (no más de 100 UFC) en la porción final del diluyente estéril usado para enjuagar el filtro.

**Inoculación Directa:** después de transferir al medio de cultivo el contenido del envase o envases a analizar agregar al medio un inóculo de un número pequeño de microorganismos viables (no más de 100 ufc).

En ambos casos, usar los mismos microorganismos que los mencionados anteriormente en *Ensayo de Promoción del Crecimiento de Organismos Aerobios, Anaerobios y Hongos*. Realizar un ensayo de promoción de crecimiento como control positivo. Incubar todos los recipientes que contienen medio durante no más de 5 días. Si después de la incubación se obtiene un crecimiento claramente visible de microorganismos, comparable visualmente con el del recipiente de control sin producto, el producto no posee actividad antimicrobiana en las condiciones de ensayo o tal actividad se ha eliminado satisfactoriamente. El ensayo de esterilidad puede entonces llevarse a cabo sin otras modificaciones. Si no se obtiene un crecimiento claramente visible en presencia del producto a evaluar, comparable visualmente con el de los recipientes de control sin producto, el producto posee actividad antimicrobiana que no se ha eliminado satisfactoriamente en las condiciones del ensayo. Modificar las condiciones con el fin de eliminar la actividad antimicrobiana y repetir el *Ensayo de Aptitud del Método*. Este ensayo de aptitud del método se lleva a cabo (a) cuando el ensayo de esterilidad tiene que realizarse en un producto nuevo; y (b) siempre que haya un cambio en las condiciones experimentales. El ensayo de aptitud del método podrá llevarse a cabo simultáneamente con el ensayo de *Esterilidad del Producto a Examinar*.

## **ENSAYO DE ESTERILIDAD DEL PRODUCTO A EXAMINAR**

### **Número de Artículos a Evaluar**

A menos que se especifique algo diferente en otra parte de este capítulo o en la monografía individual, evaluar el número de artículos especificado en la *Tabla 2*. Si el contenido de cada artículo está en cantidad suficiente, (ver la *Tabla 3*) se puede dividir para agregarlo a cada uno de los medios especificados en porciones iguales y apropiadas. [Nota —Realizar las ensayos de esterilidad empleando dos o más de los medios especificados.] Si cada artículo no contiene las cantidades suficientes para cada medio, usar el doble del número de artículos indicado en la *Tabla 3*.

**Tabla 2 – Número Mínimo de envases a Evaluar en Relación con el Número de envases del Lote**

<b>Número de envases del Lote<sup>c</sup></b>	<b>Número Mínimo de envases a Analizar<sup>a,b,d</sup></b>
<i>Preparaciones parenterales</i>	
No más de 100 envases	10% o 4 envases, lo que resulte mayor
Más de 100 pero no más de 500 envases	10 envases
Más de 500 envases	2% o 20 envases, lo que resulte menor
Preparaciones parenterales de gran volumen	2% o 10 envases, lo que resulte menor
<i>Antibióticos sólidos</i>	
Frascos con capacidad > 5 g	6 unidades
<i>Preparaciones oftálmicas y otras preparaciones no inyectables</i>	
No más de 200 envases	5% o 2 envases, lo que resulte mayor
Más de 200 envases	10 envases
<i>Producto se presenta en la forma de envases monodosis</i>	Aplicar el esquema mostrado anteriormente para preparaciones para uso parenteral
<i>Productos para salud</i>	
Hasta 100	10% o 4 unidades (lo que fuera mayor)
Desde 100 hasta 500	10 unidades
Más de 500	2% ou 20 unidades (lo que fuera menor)
<i>Productos sólidos a granel</i>	
Hasta 4 envases	Cada envase
Más de 4 envases, pero no más de 50	20% o 4 envases, lo que resulte mayor
Más de 50 envases	2% o 10 envases, lo que resulte mayor
<i>Dispositivos médicos Quirúrgicos</i>	
Catgut y otros materiales de sutura	2% o 5 envases, lo que resulte mayor, hasta un total máximo de 20 envases
No más de 100 artículos	10% o 4 artículos, lo que resulte mayor
Más de 100, pero no más de 500 artículos	10 artículos

<sup>a</sup> se considera que la muestra especificada del contenido del recipiente es suficiente para inocular ambos medios de cultivo.

<sup>b</sup> para materias primas, una muestra satisfactoria se basa en la raíz cuadrada del número total de recipientes del lote.

<sup>c</sup> Si no se conoce el tamaño del lote, usar el número máximo de unidades indicadas.

<sup>d</sup> Si el contenido de un envase es suficiente para inocular los medios, esta columna da el número de envases necesarios para los dos medios juntos.



**Tabla 3. Cantidad Mínima a Usar para cada Medio**

Cantidad por Envase	Cantidad Mínima a Usar (a menos que se justifique y autorice algo diferente)
<i>Líquidos</i>	
Menos de 1 mL	Contenido total de cada envase
1 - 10 mL	La mitad de contenido de cada envase pero no menos de un mL
Mas de 40 mL y no más de 100 mL	20 mL
Más de 100 mL	10% del contenido del envase pero no menos de 20 mL
Líquidos antibióticos	1 mL
Preparaciones insolubles, cremas, y ungüentos que deben suspenderse o emulsionarse	Usar el contenido de cada envase para suministrar no menos de 200 mg
<i>Sólidos</i>	
Menos de 50 mg	El contenido total de cada envase
50 mg o más pero menos de 300 mg	La mitad del contenido de cada envase pero no menos de 50 mg
300 mg a 5 g	1 a 50 mg
Más de 5 g	500 mg
Apósito quirúrgico-algodón-gasa en envases	100 mg por envase
Material de sutura y otro material de un solo uso envasado individualmente	El dispositivo completo
Otros dispositivos médicos	El dispositivo completo cortado en piezas o desmontado

El ensayo puede llevarse a cabo mediante la técnica de *Filtración por Membrana* o por *Inoculación Directa del Medio de Cultivo* con el producto a examinar. Se incluyen controles negativos adecuados. El método de filtración por membrana se usa cuando la naturaleza del producto lo permite, es decir, para preparaciones acuosas filtrables, para preparaciones alcohólicas o aceitosas y para preparaciones miscibles con, o solubles en, disolventes acuosos o aceitosos, siempre que dichos disolventes no posean un efecto antimicrobiano en las condiciones de ensayo.

### Filtración por Membrana

Usar filtros de membrana con un tamaño nominal de poro no mayor de 0,45  $\mu\text{m}$ , cuya eficacia para retener microorganismos haya sido establecida. Por ejemplo, se usan filtros de nitrato de celulosa para soluciones acuosas, oleosas y con bajo contenido alcohólico; y se usan filtros de acetato de celulosa, por ejemplo, para soluciones con alto contenido alcohólico. Es posible que para ciertos productos (p.ej., antibióticos) se necesiten filtros especialmente adaptados. El método descrito más adelante supone que se usarán membranas de aproximadamente 50 mm de diámetro. Si se usan filtros de un diámetro diferente, los volúmenes de las diluciones y los lavados deben ajustarse según corresponda. El aparato de filtración y la membrana se esterilizan usando técnicas adecuadas. El aparato se diseña de

tal modo que la solución a examinar se pueda introducir y filtrar en condiciones asépticas: permite retirar asépticamente la membrana para transferirla al medio de cultivo, o es adecuado para llevar a cabo la incubación dentro del aparato mismo después de agregarle el medio.

### **Soluciones acuosas**

Si corresponde, transferir una pequeña cantidad de un diluyente estéril adecuado, como por ejemplo el *Líquido A* (ver *Líquidos de Dilución y Lavado para Filtración por Membrana*), a la membrana en el aparato y filtrar. El diluyente puede contener sustancias neutralizantes adecuadas y/o sustancias inactivantes apropiadas, por ejemplo, en el caso de los antibióticos.

Transferir a la membrana o membranas el contenido del envase o envases a analizar, si fuera necesario, después de diluirlo hasta el volumen usado en el ensayo de *Aptitud del Método* con el diluyente estéril elegido, pero usando no menos de las cantidades del producto a examinar indicadas en las *Tablas 2 y 3*. Filtrar inmediatamente. Si el producto posee propiedades antimicrobianas, lavar la membrana no menos de tres veces, filtrando en cada lavado el volumen del diluyente estéril elegido usado en el ensayo de *Aptitud del Método*. El ciclo de lavado no debe exceder de cinco lavados por filtro con 200 mL cada uno, incluso si durante el ensayo de aptitud del método se ha demostrado que tal ciclo no elimina por completo la actividad antimicrobiana. Transferir la membrana completa al medio de cultivo o cortarla asépticamente en dos partes iguales y transferir cada mitad a sendos medios adecuados. Usar el mismo volumen de cada medio que el empleado en el ensayo de *Aptitud del Método*. Alternativamente, transferir el medio a la membrana en el aparato. Incubar los medios durante no menos de 14 días.

### **Sólidos solubles**

Usar para cada medio no menos de la cantidad de producto indicada en las *Tablas 2 y 3* disuelto en un disolvente adecuado, como por ejemplo el disolvente suministrado con la preparación, Agua Estéril para Inyección, solución salina estéril o una solución estéril adecuada como por ejemplo *Líquido A* (*Líquidos de Dilución y Lavado para Filtración por Membrana*), y proceder con el ensayo según lo indicado anteriormente para *Soluciones Acuosas* usando una membrana adecuada para el disolvente elegido.

### **Aceites y soluciones oleosas**

Usar para cada medio no menos de la cantidad de producto indicada en las *Tablas 2 y 3*. Los aceites y las soluciones oleosas de viscosidad lo suficientemente baja se pueden filtrar sin dilución a través de una membrana seca. Los aceites viscosos se pueden diluir según sea necesario con un diluyente estéril adecuado, como por ejemplo el miristato de isopropilo, que ha demostrado no tener actividad antimicrobiana en las condiciones del ensayo. Dejar que el aceite penetre la membrana por su propio peso y a continuación, filtrar aplicando presión o succión gradualmente. Lavar la membrana al menos tres veces filtrando cada vez aproximadamente 100 mL de una solución estéril adecuada, como por ejemplo el *Líquido A* (ver *Líquidos de Dilución y Lavado para Filtración por Membrana*), que contenga un agente emulsionante adecuado a una concentración que haya demostrado ser apropiada en el ensayo de *Aptitud del Método*, como por ejemplo

polisorbato 80 a una concentración de 10 g/L (*Líquido K*). Transferir la membrana o membranas al medio o medios de cultivo, o viceversa, según lo descrito anteriormente para *Soluciones Acuosas* e incubar a las mismas temperaturas y durante los mismos tiempos.

### **Ungüentos y cremas**

Usar para cada medio no menos de las cantidades de producto indicadas en las *Tablas 2 y 3*. Los ungüentos en base grasa y las emulsiones del tipo agua en aceite pueden diluirse al 1% en miristato de isopropilo según lo descrito anteriormente, calentando si fuera necesario a no más de 40°C. Es probable que en casos excepcionales se requiera calentar hasta no más de 44°C. Filtrar tan rápidamente como sea posible y proceder según lo descrito anteriormente para *Aceites y Soluciones Oleosas*.

### **Jeringas prellenadas**

Para jeringas prellenadas sin agujas estériles acopladas, expulsar el contenido de cada jeringa en uno o dos embudos para filtración por membrana individuales o en recipientes individuales antes de la transferencia. Si se adjunta una aguja estéril, expulsar directamente el contenido de la jeringa tal como se ha indicado anteriormente y proceder según lo descrito para *Soluciones Acuosas*. Evaluar la esterilidad de la aguja mediante el procedimiento de *Inoculación Directa* que se indica en *el Ensayo de Aptitud del Método*.

### **Sólidos para inyección distintos de antibióticos**

Reconstituir los artículos de ensayo según las instrucciones de la etiqueta y proceder según lo indicado para *Soluciones Acuosas* o *Aceites y Soluciones Oleosas*, lo que corresponda aplicar. [Nota—Si fuera necesario, se puede agregar diluyente en exceso para facilitar la reconstitución y filtración del artículo de ensayo reconstituido.]

### **Antibióticos sólidos, graneles y mezclas**

Retirar asépticamente una cantidad suficiente de sólido de la cantidad adecuada de envases (ver *Tabla 2*), mezclar hasta obtener una mezcla que equivalga aproximadamente a 6 g de sólido y transferir a un matraz Erlenmeyer estéril de 500 mL. Disolver en aproximadamente 200 mL de *Líquido A* y mezclar. Proceder según lo indicado para *Soluciones Acuosas*.

### **Productos estériles en aerosol**

Para productos líquidos en forma de aerosol presurizado, congelar los envases en una mezcla de hielo seco y alcohol por lo menos a -20°C durante aproximadamente 1 hora. Si es posible, dejar que el propelente escape antes de abrir asépticamente el envase y transferir el contenido a un recipiente de combinación estéril. Agregar 100 mL de *Líquido D* al recipiente de combinación y mezclar suavemente. Proceder según lo indicado para *Soluciones Acuosas* o para *Aceites y Soluciones Oleosas*, según corresponda.

## **Dispositivos con guías que declaran ser estériles**

Pasar asépticamente un volumen de *Líquido D* no inferior a 10 veces el volumen de las guías a través de cada dispositivo analizado. Recoger los líquidos en un recipiente estéril adecuado y proceder según lo indicado para *Soluciones Acuosas o Aceites y Soluciones Oleosas*, según corresponda. En el caso de jeringas vacías estériles, extraer diluyente estéril hacia el émbolo a través de la aguja estéril, si está acoplada, o a través de una aguja estéril acoplada para el propósito del ensayo y expulsar el contenido en un recipiente de combinación estéril. Proceder según lo indicado anteriormente.

## **INOCULACIÓN DIRECTA DEL MEDIO DE CULTIVO**

Transferir directamente en el medio de cultivo la cantidad de la preparación a examinar que se indica en las *Tablas 2 y 3*, de modo que el volumen del producto no sea mayor que el 10% del volumen del medio, a menos que se indique algo diferente.

Si el producto a examinar posee actividad antimicrobiana, realizar el ensayo después de neutralizar esta actividad con una sustancia neutralizante adecuada o mediante su dilución en una cantidad suficiente de medio de cultivo. Cuando sea necesario usar un volumen grande del producto, probablemente sea preferible usar un medio de cultivo concentrado preparado de tal modo que se tenga en cuenta la dilución subsiguiente. Cuando corresponda, el medio concentrado podrá agregarse directamente al producto en su envase.

## **Líquidos oleosos**

Usar medios a los que se les haya agregado un agente emulsionante apropiado a una concentración que haya demostrado ser adecuada en el ensayo *de Aptitud del Método*, por ejemplo polisorbato 80 a una concentración de 10 g por L.

## **Ungüentos y cremas**

Realizar una dilución de aproximadamente 1 en 10, emulsionando con el agente elegido en un diluyente estéril adecuado, como por ejemplo el *Líquido A* (ver *Líquidos de Dilución y Lavado para Filtración por Membrana*). Transferir el producto diluido a un medio que no contenga agente emulsionante.

Incubar los medios inoculados durante no menos de 14 días. Observar los cultivos varias veces durante el período de incubación. Agitar suavemente los cultivos que contengan productos oleosos todos los días. Sin embargo, cuando se use *Medio Líquido de Tioglicolato* para detectar microorganismos anaerobios, agitar o mezclar mínimamente con el fin de mantener las condiciones anaerobias

## **Sólidos**

Transferir una cantidad de producto en forma de sólido seco (o preparar una suspensión del producto agregando diluyente estéril al envase primario) correspondiente a no menos de la cantidad indicada en las *Tablas 2 y 3*. Transferir el material así obtenido a 200 mL de *Medio Líquido de Tioglicolato* y mezclar. Del mismo modo, transferir la misma cantidad a 200 mL de *Medio de Digerido de Caseína y Soja* y mezclar. Proceder según lo indicado anteriormente.

## **Algodón purificado, gasa, apósitos quirúrgicos y artículos relacionados**

De cada envase de algodón, vendas de gasa enrollada o apósitos quirúrgicos grandes que se deba evaluar, extraer asépticamente dos o más porciones de 100 a 500 mg cada una de la parte más interna de la muestra. Para materiales de un solo uso e nvasados individualmente, extraer asépticamente todo el artículo. Sumergir las porciones o el artículo en cada medio y proceder según lo indicado anteriormente .

## **Dispositivos estériles**

Los artículos pueden sumergirse ensamblados o desmontados. Para asegurar que los conductos del dispositivo también estén en contacto con los medios, sumergir la cantidad adecuada de unidades en un volumen de medio suficiente para sumergir completamente el dispositivo y proceder según lo indicado anteriormente. Para dispositivos extremadamente grandes, sumergir aquellas porciones del dispositivo que han de entrar en contacto con el paciente en un volumen de medio suficiente para lograr la inmersión completa de esas porciones.

Para catéteres en los que se requiere la esterilidad del lumen interno y de la parte externa, cortarlos en piezas de modo que el medio entre en contacto con todo el lumen, o llenar el lumen con medio y sumergir la unidad intacta.

## **OBSERVACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

A intervalos durante el período de incubación, y al momento de su finalización, examinar los medios en busca de evidencias macroscópicas de crecimiento microbiano. Si el material que se está evaluando enturbia el medio de modo que no puede determinarse fácilmente la presencia o ausencia de crecimiento microbiano mediante examen visual, transferir porciones de medio (no menores de 1 mL cada una) 14 días después de comenzada la incubación, a recipientes nuevos con el mismo medio y, a continuación, incubar el recipiente original y el de transferencia durante no menos de 4 días.

Si no se hallan evidencias de crecimiento microbiano, el producto examinado cumple con el ensayo de esterilidad. Si se hallan ensayos de crecimiento microbiano, el producto examinado no cumple con el ensayo de esterilidad, a menos que pueda demostrarse claramente que el ensayo resultó inválido por causas no relacionadas con el producto examinado. El ensayo puede considerarse inválido sólo si se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

- Los datos de monitoreo microbiológicos de las instalaciones para ensayos de esterilidad demuestran una falla.
- Una revisión del procedimiento analítico usado durante el ensayo en cuestión revela un error.
- Se halla crecimiento microbiano en los controles negativos.
- Después de determinar la identidad de los microorganismos aislados del ensayo, el crecimiento de esta especie (o especies) puede atribuirse de manera inequívoca a errores con respecto al material o a la técnica usados al realizar el procedimiento del ensayo de esterilidad.

Si el ensayo se declara inválido, se repetirá con el mismo número de unidades del ensayo original. Si no se hallan ensayos de crecimiento microbiano en el ensayo repetido, el producto examinado cumple con el ensayo de esterilidad. Si se halla crecimiento microbiano en el ensayo repetido, el producto examinado no cumple con el ensayo de esterilidad.

## **Aplicación del ensayo a preparaciones parenterales, oftálmicas y otras preparaciones no inyectables que deben cumplir con el ensayo de esterilidad**

Al usar la técnica de filtración por membrana, utilizar, siempre que sea posible, el contenido total del envase, pero no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2*, diluyendo cuando sea necesario hasta aproximadamente 100 mL con una solución estéril adecuada, como por ejemplo el *Líquido A* (ver *Líquidos de Dilución y Lavado para Filtración por Membrana*).

Al usar la técnica de inoculación directa de medios, usar las cantidades que se muestran en la *Tabla 2*, a menos que se justifique y autorice algo diferente. El ensayo de esterilidad bacteriana y fúngica se lleva a cabo sobre la misma muestra del producto a examinar. Cuando el volumen o la cantidad de un único envase sea insuficiente para llevar a cabo el ensayo, se usará el contenido de dos o más envases para inocular los distintos medios.

### **Número mínimo de artículos a analizar**

En la *Tabla 3* se indica el número mínimo de artículos a analizar en relación con el tamaño del lote.