

370. ENSAYOS DE ESTERILIDAD

Los siguientes ensayos se emplean para verificar la ausencia de contaminación por microorganismos en productos esterilizados o preparados asépticamente. La ausencia de contaminación microbiana, evidenciada por estos procedimientos, 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.

El ensayo de esterilidad se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, por lo tanto el entorno del ensayo debe adaptarse a la manera en que éste se realice. Durante el desarrollo del ensayo, el área de trabajo no debe estar expuesta a la luz ultravioleta directa ni sometida a otros agentes esterilizantes. Las medidas para evitar la contaminación no deben afectar a ningún microorganismo que pudiera estar presente en la muestra. Las condiciones de trabajo en las que se efectúan los ensayos, se monitorean regularmente mediante el muestreo adecuado del área de trabajo y la realización de controles apropiados.

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se preparan de acuerdo a lo indicado en *Medios de cultivo y Reactivos para Ensayos Microbiológicos* en *Reactivos y Soluciones*. Los medios de cultivo deben cumplir con los ensayos de promoción de crecimiento según se indica en este capítulo.

El Medio Fluido de Tioglicolato debe incubarse a 30 – 35 °C. Para productos que contienen un conservante mercurial que no se pueden analizar mediante el *Método de filtración por membrana*, se puede utilizar el Medio Fluido de Tioglicolato incubado a 20 – 25 °C en lugar de Caldo Digerido de Caseína - Soja, siempre y cuando cumpla con la *Prueba de promoción de crecimiento de los medios de cultivo* con los seis microorganismos descritos en la *Tabla 1*.

Es posible utilizar Caldo Tioglicolato Alternativo para los casos en que se prescriba o justifique. El medio a emplear debe ser recientemente esterilizado o podrá calentarse una sola vez en un baño de vapor y enfriado rápidamente antes de su empleo de modo de

asegurar la ausencia de oxígeno. Incubar a 30 – 35 °C bajo condiciones anaeróbicas.

ESTERILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Verificar la esterilidad de cada lote incubando una muestra del mismo a la temperatura correspondiente a cada medio, durante 14 días o incubando un recipiente con medio no inoculado como control negativo en paralelo al ensayo de esterilidad.

PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Examinar cada lote de medio de cultivo para determinar su capacidad de promover el crecimiento microbiano a través de la inoculación con no más de 100 ufc de microorganismos viables de cada una de las cepas descritas en la *Tabla 1* en recipientes separados. El volumen del inóculo no deberá ser mayor al 1 % del volumen del medio preparado. Incubar en las condiciones especificadas.

Los medios de cultivo son aceptables si existen evidencias de crecimiento claramente visible en todos los recipientes inoculados dentro de los 3 días de incubación para bacterias aeróbicas y anaeróbicas y 5 días para hongos filamentosos y levaduras. El ensayo de esterilidad no es válido si el medio de cultivo presenta una respuesta inapropiada al crecimiento microbiano. Emplear cultivos con no más de cinco repiques desde su extracción del cultivo original de los microorganismos que figuran en la *Tabla 1* (ver *Preparación de las cepas de prueba* en 90. *Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles*).

Examinar cada lote de medio de cultivo para determinar su capacidad de promover el crecimiento microbiano a través de la inoculación con no más de 100 ufc de microorganismos viables de cada una de las cepas descritas en la *Tabla 1* en recipientes separados. El volumen del inóculo no deberá ser mayor al 1 % del volumen del medio preparado. Incubar en las condiciones especificadas.

Los medios de cultivo son aceptables si existen evidencias de crecimiento claramente visible en todos los recipientes inoculados dentro de los 3 días

de incubación para bacterias aeróbicas y anaeróbicas y 5 días para hongos filamentosos y levaduras. El ensayo de esterilidad no es válido si el medio de cultivo presenta una respuesta inapropiada al crecimiento microbiano. Emplear cultivos (ver *Preparación de las cepas de prueba en 90. Control microbiológico de productos no obligatoriamente estériles*) con no más de cinco repiques desde su extracción del cultivo original de los microorganismos que figuran en la *Tabla 1*.

ENSAYO DE APTITUD

Antes de efectuar un ensayo de esterilidad de un producto, se deberá demostrar la ausencia de actividad bacteriostática y fungistática del mismo.

El ensayo de aptitud deberá efectuarse cada vez que se cambia alguna condición del ensayo o cuando exista un cambio significativo en la composición del producto.

Los microorganismos de prueba para la realización del ensayo de aptitud son los indicados en la *Tabla 1*. Es recomendable incluir al menos una cepa aislada y caracterizada del ambiente de fabricación.

Durante el periodo de incubación registrar y comparar diariamente las observaciones visuales tanto de los microorganismos desafiados con la muestra como de los medios con cada microorganismo, según corresponda.

Determinación de la Aptitud cuando se emplea el Método de filtración por membrana

Filtrar la cantidad de muestra especificada en las *Tablas 2, 3 y 4*.

Lavar la membrana con al menos tres porciones de 100 mL del líquido de lavado, inoculando el lavado final con no más de 100 ufc de los microorganismos de prueba, por separado.

Realizar un control positivo, siguiendo el procedimiento descrito, pero en ausencia de muestra, inoculando cada microorganismo de prueba en los correspondientes medios.

Colocar cada membrana o mitad de la membrana en 100 mL del medio de cultivo especificado o agregar el medio especificado al dispositivo que contiene la membrana. Incubar todos los recipientes que contienen medio de cultivo a la temperatura apropiada y bajo las condiciones especificadas en la *Tabla 1*, por un período no mayor de 5 días.

Si el crecimiento de los microorganismos en el medio de cultivo que contiene la muestra fuera visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto no posee actividad antimicrobiana en las condiciones de la prueba o tal actividad se ha eliminado satisfactoriamente. En

adelante efectuar el ensayo de esterilidad en las mismas condiciones.

Si el crecimiento no fuera visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto posee propiedades bacteriostáticas y/o fungistáticas. Repetir aumentando número y volumen de lavados hasta un máximo de 10 lavados de 100 mL cada uno, y/o cambiando el tipo de membrana, y/o empleando un agente neutralizante, tal como lecitina o polisorbato 80. También puede ser necesario el agregado de una beta-lactamasa apropiada a los medios de cultivo y/o a los líquidos de lavado para el caso de penicilinas y cefalosporinas. Si después de haber realizado todas las modificaciones en las condiciones de ensayo no se logró obtener una turbidez visualmente comparable entre el tubo que contiene la muestra y el control positivo, efectuar el ensayo de esterilidad empleando las condiciones más exigentes.

Determinación de la Aptitud cuando se emplea el Método de siembra directa

Inocular dos recipientes de cada medio de cultivo con no más de 100 ufc de cada uno de los microorganismos especificados en la *Tabla 1*. El volumen del inóculo no deberá ser mayor al 1 % del volumen del medio preparado. Agregar la cantidad de muestra especificada en las *Tablas 2, 3 y 4* a uno de los recipientes. El otro recipiente será el control positivo. El volumen de producto no debe superar el 10 % del volumen de medio de cultivo. Repetir el procedimiento para cada cepa e incubar durante no más de 5 días.

Si el producto que se está evaluando enturbia el medio, transferir al quinto día de incubación porciones de medio (no menores de 1 mL) a recipientes con medio fresco y continuar incubando los recipientes de transferencia durante no menos de 4 días. Proceder del mismo modo con el control positivo. Al término del período de incubación comparar la turbidez de ambas transferencias.

Si el crecimiento de los microorganismos en la mezcla de producto y medio de cultivo fuera visualmente comparable al observado en el control positivo, en adelante efectuar el ensayo de esterilidad en las mismas condiciones.

Si el crecimiento no fuera visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto posee propiedades bacteriostáticas y/o fungistáticas. Repetir el ensayo empleando agentes neutralizantes estériles, como polisorbato 80, lecitina o penicilinas, o incrementar el volumen de medio. Si se incrementó el volumen del medio a 2 litros y aún se manifiestan propiedades antimicrobianas, proceder con el ensayo de esterilidad utilizando dicho volumen.

PROCEDIMIENTO GENERAL

El ensayo debe realizarse en condiciones asépticas bajo Clase A o su denominación equivalente.

Emplear el *Método de filtración por membrana*, según se describe a continuación, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Tanto para el *Método de Filtración por membrana* como para el *Método de Siembra directa*, proceder según la metodología determinada para el producto en el *Ensayo de Aptitud*.

Limpiar la superficie exterior de los envases con un agente descontaminante apropiado y acceder al contenido de los mismos en forma aséptica. Si fuera envasado al vacío, se deben compensar las presiones en condiciones asépticas.

Cantidad de muestra y condiciones de incubación

Emplear los números de unidades y cantidades indicados en las *Tablas 2, 3 y 4*.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente o en una sección de este capítulo, incubar la mezcla de ensayo durante no menos de 14 días en los medios de cultivo y en las condiciones especificadas en la *Tabla 1*.

Cuando el material ensayado produce turbidez en el medio y la observación visual del crecimiento de bacterias u hongos es dificultosa, al finalizar el período de incubación, transferir porciones de no menos de 1 mL de la mezcla que contiene la muestra y el medio a envases con medio de cultivo nuevo. Se debe continuar con la incubación de ambas muestras, la inicial y la transferida por no menos de 4 días adicionales.

Durante el período de incubación registrar diariamente las observaciones visuales de cada medio de cultivo del ensayo.

Método de filtración por membrana

En un dispositivo que posibilite el filtrado aséptico emplear filtros de membrana con un tamaño nominal de poro no mayor de 0,45 μm cuya eficacia para retener microorganismos haya sido establecida.

Generalmente se usan membranas de nitrato de celulosa para soluciones acuosas, oleosas y con bajo contenido alcohólico. Para soluciones con alto contenido alcohólico se usan membranas de acetato de celulosa. Para minimizar la inhibición microbiana de los residuos podrán utilizarse membranas con borde hidrófobo o de baja retención.

En el caso de soluciones acuosas, si corresponde, transferir una pequeña cantidad de un

diluyente estéril adecuado, como por ejemplo *Solución A* (ver *Medios de cultivo y reactivos para ensayos microbiológicos* en *Reactivos y Soluciones*), a la membrana en la unidad filtrante y filtrar.

Cuando el producto a ser ensayado es un aceite, es conveniente que la membrana esté completamente seca antes de realizar el ensayo.

Soluciones acuosas - Emplear para cada medio de cultivo no menos de las cantidades de producto indicadas en las *Tablas 2 y 3*. Transferir una pequeña porción del diluyente para humedecer la membrana. Proceder según la metodología determinada en el *Ensayo de Aptitud*.

Sólidos solubles - Emplear para cada medio de cultivo no menos de las cantidades de producto indicadas en las *Tablas 2 y 4*. Disolver en el líquido adecuado (por ejemplo, el disolvente proporcionado con la preparación, agua para soluciones inyectables, solución salina o *Solución A* (ver *Medios de cultivo y reactivos para ensayos microbiológicos* en *Reactivos y Soluciones*) que haya sido empleado en el *Ensayo de Aptitud*.

Aceites y soluciones oleosas - Emplear para cada medio de cultivo las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 3*. Si la viscosidad es baja, filtrar sin diluir utilizando la membrana completamente seca. Si la viscosidad es alta puede ser necesario diluir en un diluyente estéril adecuado, como miristato de isopropilo, que demuestre no tener propiedades antimicrobianas en las condiciones del ensayo. Dejar que el aceite penetre en la membrana por su propio peso y a continuación filtrar aplicando presión o succión gradualmente. Lavar la membrana con un líquido adecuado, por ejemplo *Solución D*, *Solución K* (ver *Medios de cultivo y reactivos para ensayos microbiológicos* en *Reactivos y Soluciones*) u otra solución con una concentración predeterminada de emulsionante que haya sido demostrada apropiada durante el *Ensayo de Aptitud* de la metodología.

[NOTA: si los líquidos son viscosos y difíciles de filtrar, se pueden emplear más de dos dispositivos. Se incuba en cada medio la mitad del número de membranas empleadas, cuidando que los volúmenes y el número de envases se ajusten a las condiciones especificadas.]

Ungüentos y cremas - Emplear para cada medio de cultivo no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 3 ó 4*, según corresponda. Los ungüentos con base grasa y las emulsiones del tipo agua en aceite, pueden disolverse al 1 % en miristato de isopropilo. De ser necesario calentar hasta no más de 40 °C. Excepcionalmente podrá admitirse calentar hasta no más de 44 °C. Proceder según la metodología determinada en el *Ensayo de*

Aptitud. Filtrar tan rápidamente como sea posible y proceder según se indica en *Aceites y soluciones oleosas*.

Jeringas prellenadas - Emplear para cada medio de cultivo no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 3*. Si la jeringa tiene la aguja acoplada, vaciar el líquido a través de la misma en la unidad filtrante o en la solución diluyente. Si la jeringa tiene aguja no acoplada, vaciar directamente el líquido en la unidad filtrante o en la solución diluyente y evaluar la esterilidad de la aguja por separado según el *Método de Siembra Directa*. Proceder según la metodología determinada en el *Ensayo de Aptitud*

Aerosoles - Emplear para cada medio de cultivo no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 3 ó 4*, según corresponda. Extraer la muestra asépticamente utilizando el método conveniente, por congelamiento del envase o por uso de válvula continua. Colocar el contenido de todos los envases en un recipiente estéril. Agregar al menos 100 mL de una solución diluyente que se haya demostrado apropiada. Proceder según la metodología del *Ensayo de Aptitud*.

Dispositivos médicos con guías y jeringas vacías estériles - Emplear para cada medio no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 4*.

En el caso de las guías, pasar un volumen de Solución D (ver *Medios de cultivo y reactivos para ensayos microbiológicos en Reactivos y Soluciones*) no inferior a 10 veces el volumen de éstas. Recolectar los líquidos en un recipiente adecuado. En el caso de jeringas vacías, con aguja acoplada, llenar cada una de ellas con un líquido estéril que haya sido demostrado apto y vaciar el líquido a través de la misma en la unidad filtrante o en la solución diluyente. Si la jeringa no tiene aguja acoplada o para acoplar, podrá utilizarse una aguja sólo para los propósitos del ensayo. Llenar y vaciar directamente el líquido a través de la misma en la unidad filtrante o en la solución diluyente. Proceder según la metodología determinada en el *Ensayo de Aptitud*

Método de siembra directa

Transferir directamente al medio de cultivo la cantidad de muestra indicada en las *Tablas 2 y 3 ó 4* según corresponda, de modo que el volumen de producto no sea mayor del 10 % del volumen del medio, a menos que se indique de otro modo en la monografía correspondiente.

Si el producto a examinar tiene actividad antimicrobiana llevar a cabo el ensayo después de neutralizar esta actividad con un agente adecuado o por dilución en una cantidad suficiente de medio de

cultivo, según haya sido demostrado en el *Ensayo de Aptitud* de la metodología.

Cuando sea necesario usar un volumen grande del producto, probablemente sea preferible emplear 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.

[NOTA: si por el volumen o dimensiones (tamaño) de la muestra a ensayar se debe utilizar un volumen de medio demasiado grande, puede emplearse más de un frasco de cada medio de cultivo por ensayo, cuidando que los volúmenes se ajusten a las condiciones especificadas.]

Líquidos oleosos - Emplear para cada medio de cultivo no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 3*. Agregar un agente emulsionante apropiado a los medios de cultivo en concentración tal que durante el *Ensayo de Aptitud* haya demostrado ser adecuado, por ejemplo polisorbato 80 en una concentración de 10 g por litro.

Ungüentos y cremas - Emplear para cada medio de cultivo no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 4*. De ser necesario, podrá realizarse una dilución de aproximadamente 1 en 10, agregando un agente emulsionante por ejemplo Solución D. Transferir el producto diluido a los medios de cultivo.

[NOTA: agitar diariamente los medios conteniendo productos oleosos cuidando de hacerlo con suavidad preservando las condiciones anaeróbicas en el Medio Fluido de Tioglicolato.]

Sólidos - Emplear para cada medio no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 4*. Transferir una cantidad de producto o preparar una suspensión del producto en diluyente estéril en el envase primario. Transferir el material obtenido a 200 mL de medios de cultivo, o el volumen establecido en el *Ensayo de Aptitud* de la metodología y mezclar.

Algodón purificado, gasa, apósitos quirúrgicos y dispositivos relacionados - Emplear para cada medio de cultivo no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 4*. De cada envase de algodón, gasa o apósitos, extraer asépticamente 2 o más porciones de 100 a 500 mg cada una, de la parte más interna del envase. Si se trata de artículos descartables envasados individualmente, usar todo el contenido del envase. Sumergir en cada uno de los medios de cultivo según lo establecido en el *Ensayo de Aptitud*.

Dispositivos médicos estériles - Emplear para cada medio de cultivo no menos de las cantidades indicadas en las *Tablas 2 y 4*. Sumergir los

dispositivos completamente, ensamblados o desmontados, en cantidad suficiente de medios de cultivo, asegurando que la parte interna de las guías o conductos esté en contacto con el medio de cultivo. Si el dispositivo es demasiado grande, sumergir completamente en los medios de cultivo las porciones que deben entrar en contacto directo con el paciente. Para catéteres cortar en piezas para que todo el dispositivo esté en contacto con el medio o llenar el lumen con el medio de cultivo y luego sumergir la unidad entera. Para dispositivos en los cuales el lumen es demasiado pequeño como para permitir el paso del Medio Fluido de Tioglicolato, sustituir dicho medio por el Caldo Tioglicolato alternativo siempre que luego se incube en anaerobiosis.

OBSERVACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Examinar los medios de cultivo durante el período de incubación y al final del ensayo, en busca de evidencia macroscópica de desarrollo microbiano.

Tal como se indica en el apartado *Cantidad de muestra y condiciones de incubación*, si el material que se está evaluando enturbia el medio de modo que no puede determinarse fácilmente la presencia o ausencia de desarrollo microbiano mediante examen visual, transferir porciones de medio, no menores de 1mL cada una, cumplidos los 14 días de 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 desarrollo microbiano, la muestra cumple con el ensayo de esterilidad.

Si en cambio hay evidencia de desarrollo microbiano, la muestra no cumple con el ensayo, a menos que pueda demostrarse claramente que el ensayo es inválido y que la causa de la contaminación no está relacionada con el producto.

El ensayo puede considerarse inválido sólo si se cumplen una o más de las siguientes condiciones:

- los resultados de los monitoreos microbiológicos (ambiente, superficies y/o personal) donde se efectuó el ensayo demuestran falla,
- se revela un error en el procedimiento usado en el ensayo,
- se halla desarrollo microbiano en los controles negativos,
- la identificación del microorganismo aislado revela inequívocamente que hubo fallas con respecto al material o a la técnica usados.

Si el ensayo se declara inválido, se repetirá con el mismo número de unidades de la prueba original.

Si no hay desarrollo microbiano en la repetición, el producto cumple con el ensayo de esterilidad. Si en cambio hay desarrollo microbiano, el producto no cumple con el ensayo.

Tabla 1. Medios de cultivo, microorganismos y condiciones de incubación

Medio	Microorganismos de prueba	Incubación	
		Temperatura	Condiciones
Medio Tioglicolato	• <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	30 - 35 °C	
	• <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 ⁽¹⁾	30 - 35 °C	Aeróbicas
	• <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437 ⁽²⁾	30 - 35 °C	
Caldo Tioglicolato Alternativo ⁽³⁾	• <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	30 - 35 °C	Anaeróbicas
Caldo digerido de caseína - soja	• <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20 - 25 °C	
	• <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20 - 25 °C	Aeróbicas
	• <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	20 - 25 °C	

(1) Como alternativa a *Pseudomonas aeruginosa*, puede utilizarse *Kocuria rhizophila* ATCC 9341.

(2) Como alternativa a *Clostridium sporogenes* y en caso de no ser requerido un esporoformador, puede utilizarse *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482.

(3) Utilizar para ensayo de esterilidad de dispositivos médicos que contienen tubos de pequeño diámetro.

NOTA: Pueden utilizarse cepas ATCC o cepas aptas para tales fines pertenecientes a colecciones de cultivos microbianos reconocidas por la WFCC (World Federation of Culture Collections).

Tabla 2. Número mínimo de unidades a ensayar en relación al tamaño del lote

<i>Tamaño del lote *</i>	<i>Número mínimo de envases muestreados para cada medio**</i>
<i>Productos inyectables</i>	
≤ 100 unidades	10 % ó 4 (el que sea mayor)
> 100 - ≤ 500 unidades	10
> 500 unidades	2 % ó 20 (el que sea menor)
Parenterales de gran volumen	2 % ó 10 (el que sea menor)
<i>Antibióticos sólidos</i>	
Envases de < 5 g	20
Envases de ≥ 5 g	6
Graneles y mezclas	Ver <i>Productos sólidos a granel</i>
<i>Ofiálmicos y otros productos no inyectables</i>	
≤ 200 unidades	5 % ó 2 (el que sea mayor)
> 200 unidades	10
Si el producto a ensayar se presenta en la forma de envases monodosis, aplicar el esquema mostrado anteriormente para productos inyectables.	
<i>Dispositivos médicos</i>	
≤ 100 unidades	10 % ó 4 (el que sea mayor)
> 100 - ≤ 500 unidades	10
> 500 unidades	2 % ó 20 (el que sea menor)
<i>Productos sólidos a granel</i>	
≤ 4 envases	Todos
> 4 - ≤ 50 envases	20 % ó 4 (el que sea mayor)
> 50 envases	2 % ó 10 (el que sea mayor)

* Si no se conoce el tamaño del lote, emplear el número máximo de envases indicado en esta tabla.

** Si el contenido de un envase es suficiente para inocular los dos medios, según las cantidades indicadas en las *Tablas 3 ó 4*, esta columna establece el número de envases totales a utilizar.

Tabla 3. Cantidades a ensayar de cada envase para productos líquidos

<i>Contenido del envase (mL)</i>	<i>Volumen mínimo de cada envase para cada medio</i>
< 1	Todo el contenido
1 - ≤ 40	La mitad del contenido de cada envase pero no menos de 1 mL
> 40 - ≤ 100	20 mL
> 100	10 % del volumen pero no menos de 20 mL
Antibióticos (líquidos)	1 mL

Tabla 4. Cantidades a ensayar de cada envase para productos sólidos y semisólidos

<i>Contenido del envase</i>	<i>Cantidad mínima de cada envase para cada medio</i>
< 50 mg	Contenido completo
50 mg - < 300 mg	Mitad del contenido pero no menos de 50 mg
300 mg - ≤ 5 g	150 mg
> 5 g	500 mg
Antibióticos	150 mg
Algodón, gasa	100 mg
Suturas y otros materiales descartables	Envase completo
Dispositivos médicos	Dispositivo completo
Preparaciones insolubles, cremas y ungüentos	No menos de 200 mg de contenido de cada envase