

## 6. Controles microbiológicos

Asegurar la esterilidad de los preparados elaborados es fundamental para la seguridad de los pacientes, ya que, un producto contaminado puede producir graves complicaciones en los pacientes a los que se les administre.

La esterilidad de un producto no siempre se puede garantizar por la realización de ensayos esterilidad; **por consiguiente**, se tiene que asegurar por la aplicación de un proceso de elaboración adecuadamente validado, controlando las instalaciones (limpieza, presión, temperatura, mantenimiento preventivo de las cabinas y de las salas...), la formación continuada del personal que trabaja en la preparación de medicamentos estériles y todos los procesos implicados en la elaboración de medicamentos.

El ensayo de esterilidad deberá considerarse sólo como el último elemento de una serie de medidas de control mediante las que se garantice la esterilidad.

Existen distintos momentos durante la elaboración en los que debemos hacer controles microbiológicos: validación de la técnica aséptica de los elaboradores, control ambiental y test de esterilidad.

### 6.a. Validación de la técnica aséptica

#### 6..a. El personal conoce los procedimientos de control microbiológico ambientales

Uno de los aspectos que se debe incluir dentro de la formación del elaborador es un examen práctico de la técnica aséptica empleada.

Se recomienda hacer el mismo proceso que se quiere validar pero sustituyendo los componentes de la nutrición, el colirio o el proceso que queremos validar por medios de cultivo. A continuación hay un ejemplo de un proceso de validación de nutrición parenteral (Nutr Hosp. 2013;28(5):1494-1497)

Hoja de elaboración para la validación de la técnica aséptica del personal de enfermería

**Material necesario:**

- 2 viales de TSB de 100 ml
- 1 ampolla de agua de 10 ml
- 1 frasco de agua de 500 ml
- 12 jeringas de 5 ml
- 1 sistema de transferencia
- 1 bolsa de NP de 250 ml

**Metodología:**

- Se debe trabajar en cabina de flujo laminar horizontal.
- Coger 5 ml de la ampolla de agua con la jeringa de 5 ml e inyectarlo en un vial de TSB. Repetirlo en el otro vial.
- Coger 5 veces 1 ml del frasco de agua con 5 jeringas diferentes e inyectarlo en un vial de TSB. Repetirlo en el otro.
- Conectar el sistema de transferencia a los dos viales de TSB y pasar el contenido de ambos a una bolsa de NP de 250 ml.
- Retirar el sistema y cerrar la bolsa.
- Etiquetar la bolsa y poner en una bolsa de plástico.
- Firmar la hoja de elaboración

Características del producto acabado: líquido transparente de color marrón claro, libre de partículas.

Conservación: Enviar al Servicio de Microbiología e incubar 7 días a temperatura ambiente y posteriormente otros 7 días a 30-35°.

Si el producto se ha contaminado durante el proceso se debería revisar el proceso con el elaborador.

## **6.b Controles ambientales**

### 6.b.a. El personal conoce los procedimientos de control microbiológico ambientales.

Las cabinas de flujo laminar, las salas donde se preparan medicamentos estériles y los guantes del personal manipulador deben controlarse de forma habitual para garantizar, tanto su correcto funcionamiento, como la ausencia de contaminación microbiológica. Los puntos de monitorización y la frecuencia deben basarse en un estudio formal de análisis de riesgos.

En la guía de buenas prácticas de preparación de medicamentos se recomiendan hacer los controles con las siguientes frecuencias

*Frecuencias recomendadas para la monitorización microbiológica.*

Método	Frecuencia (zona de trabajo)	Frecuencia (entorno zona de trabajo)
Placas sedimentación	Cada sesión de trabajo	Semanalmente
Dedos de guantes	Al final de cada sesión	Al final de cada sesión
Placas de contacto	Semanalmente	Mensualmente
Muestras de aire	Trimestralmente	Trimestralmente

Si se exceden los niveles de alerta en ocasiones aisladas puede que no sea necesaria ninguna otra acción que la de examinar los sistemas de control. No obstante, la frecuencia con la que se excedan esos límites debe estudiarse. Si la frecuencia aumentara entonces habría que adoptar medidas para disminuirla.

#### **6.b.a.1. Control microbiológico del aire, tanto de cabinas de flujo laminar, como de las salas limpias y presalas.**

El método recomendado para control de microbiológico ambiental, tanto del aire en cabina de flujo laminar, como de las salas limpias y presalas, es el método por impactación, que puede realizarse mediante:

- Aparatos de muestreo. Se recomienda en áreas con riesgo alto de contaminación. Se recolecta un volumen de aire entre 400-1000L en cada localización.
- Placas con medio de cultivo para bacterias y hongos. Se dejan abiertas 3-4 horas manipulándolas en todo momento con técnica aséptica para evitar contaminarlas durante el muestreo. Los tiempos de incubación son: bacterias  $35 \pm 2$  °C 2-3 días y hongos  $28 \pm 2$  °C 5-7 días.

**6.b.a.2. Control microbiológico de superficies de trabajo.**

El método recomendado para control microbiológico de superficies de trabajo es el de impactación sobre placas RODAC o similares, presionando ligeramente en puntos preestablecidos. Siempre debe realizarse al final de la elaboración.

**6.b.a.3. Control microbiológico de guantes del manipulador.**

El método consiste en presionar con los guantes de ambas manos (presión ligera de los cinco dedos) sobre sendas placas (periodo de incubación:  $35 \pm 2$  °C 2-3 días).

- Tras el periodo de formación de cualquier manipulador nuevo, después del lavado de manos y colocación de la indumentaria.
- Después de realizar el test de simulación del proceso (media-fill test) sin aplicar alcohol 70°, para valorar la técnica aséptica.
- A intervalos periódicos para certificar la competencia del personal.

La persona que recibe una notificación de contaminación (y por extensión cualquier notificación de no conformidad de un preparado) debe saber a qué facultativo informar (en todo caso al responsable de elaboración) y en qué casos debe proceder automáticamente, a la inmovilización del producto contaminado.

**6.c. Test de esterilidad del producto terminado**

**6.c.a.1 El personal conoce cómo obtener muestras representativas de los lotes elaborados**

Para obtener una muestra representativa deben incluirse especialmente muestras tomadas de las partes del lote que se consideren con mayor riesgo de contaminación, por ejemplo:

- En el caso de productos que se hayan llenado asépticamente, las muestras deben obtenerse de las unidades llenadas al principio y al final del lote, y, después de cualquier intervención significativa (como el último vial antes de cambiar el filtro).
- En el caso de productos que se hayan sometido a esterilización por calor en su envase final, debe procurarse tomar muestras procedentes de la parte potencialmente más fría de la carga.

En el caso de Nutriciones parenterales la Farmacopea Francesa y Británica establecen, para soluciones de gran volumen, la toma de una muestra del 10% o un mínimo de 50ml, sin pérdida de la unidad examinada.

Según la GBPM, en el caso de preparaciones estériles compuestas por más de 25 unidades/lote se debe realizar un control de calidad fisicoquímico y microbiológico antes de la aprobación y liberación del producto terminado.

#### **6.c.a.2 El personal conoce los procedimientos del centro para la realización de controles microbiológicos rutinarios de los productos que se preparan.**

El ensayo de esterilidad se realiza en condiciones asépticas para evitar la contaminación de la muestra durante la prueba. Existen dos procedimientos distintos para la realización del test de esterilidad uno por inoculación directa de la muestra en un medio de cultivo y otro por filtración.

Los medios de cultivo utilizados son los mismos en los dos tipos de pruebas:

- Tioglicolato (FTG) para bacterias anaerobias y aerobias.
- Fluido Tripticasa Soja (TSB) para hongos y bacterias aerobias.

Estos medios de cultivo favorecen el crecimiento de microorganismos por lo que si la muestra que se siembra está contaminada podremos detectarlo.

### **Siembra directa en un medio de cultivo**

Consiste en transferir directamente a los medios de cultivo, **mediante técnica aséptica**, la cantidad de preparación a examinar indicada en el procedimiento correspondiente. Una mala manipulación durante la siembra puede dar falsos positivos.

Cuando sea necesario examinar un volumen grande del producto, es preferible usar medios de cultivo concentrados, preparados de manera que se tenga en cuenta la dilución posterior. En ciertos casos el medio de cultivo concentrado puede añadirse directamente al producto a examinar en su envase.

En el caso de Nutriciones parenterales en las que tenemos que tomar una muestra de al menos 50 ml se debe procurar que el volumen del medio de cultivo sea unas 10 veces superior al de la muestra, para que la osmolaridad de ésta no afecte al crecimiento microbiano (por ejemplo, para 50 mL de muestra el volumen idóneo será 500 mL de medio).

### **Filtración a través de membrana**

Este es el método recomendado por la Real Farmacopea Española aunque no es el más empleado a nivel de formulación magistral y preparados hospitalarios.

En este proceso se utiliza un aparato que permite mantener la asepsia de todo el proceso. Tanto el aparato de filtración, como la membrana, se esterilizan por los medios adecuados.



Mediante un sistema conectado a la muestra, esta se hace pasar a través de dos filtros incluidos dentro de otros dos envases estériles. Una vez filtrada la muestra se elimina todo el líquido sobrante, quedando retenida en el filtro las partículas con un tamaño mayor al del poro.

A continuación, cada uno de los frascos se llena con un medio de cultivo diferente: un frasco se llena con TSB y otro con FTG.

En nutrición parenteral el método de filtración recomendado consiste en tomar dos muestras de la NP, de 50 y 20 mL. La muestra de 50 mL es utilizada para el ensayo microbiológico y la de 20 mL es utilizada como control en el caso de crecimiento microbiano en la muestra de 50mL.

La muestra de 50 mL se mezcla con igual volumen de una solución estéril al 4% de polisorbato 80 (Tween 80) en agua para inyección. La mezcla se agita y se filtra con ayuda de vacío a través de un filtro de membrana de nitrato de celulosa de 0,45 µm. Después de la filtración, el filtro se lleva a un medio agar-sangre y se incuba en una atmósfera enriquecida con 5-7% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, y posteriormente se lleva a 20°C en una atmósfera aeróbica durante 5 días.

Una vez sembrados los medios de cultivo, independientemente del método utilizado, se deben incubar 14 días a las temperaturas recomendadas TSB 20- 25°C y FTG 30-35°C. Se incubarán los medios sembrados y otros dos medios sin sembrar como blancos.

Al final del periodo de incubación la contaminación se manifiesta por la aparición de turbidez, motas o floculación en el medio, mientras el medio sin inocular permanece transparente y sin turbidez. Si el material analizado causa turbidez del medio, se deben realizar subcultivos en medios sólidos apropiados después de la incubación para decidir si la turbidez se debe al material solamente o a los microorganismos que se han multiplicado en el caldo.

Si se confirma la contaminación se debe considerar todo el lote contaminado salvo que se pueda probar que se ha contaminado durante el test de esterilidad.

## *Tema-6: Controles microbiológicos*

En caso de preparación por lotes, mientras se realiza el control de esterilidad, la muestra se queda en cuarentena hasta que se obtengan los resultados y se pueda liberar el lote.

BORRADOR