UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Esterilidade: Validação de Metodologia e Propostas de
Otimização de Resultados**

Adriana Bugno

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:
Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2001

Adriana Bugno

**Esterilidade: Validação de Metodologia e Propostas de
Otimização de Resultados**

COMISSÃO JULGADORA

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Prof.ª Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientador/Presidente

Dr.ª Nádia Araci Bou Chacra
Primeiro Examinador

Prof.ª Tit. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
Segundo Examinador

São Paulo, 12 de Fevereiro de 2001

Aos meus pais
A quem devo a existência, a formação e orientação de vida

À minha família e amigos
Pela dedicação, apoio, incentivo e compreensão

À Profa. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Pela amizade, dedicada orientação, constante apoio e
pelo exemplo de trabalho a ser seguido

Ao Instituto Adolfo Lutz, representado pelo Dr. Cristiano Correia de Azevedo Marques, pelo apoio e incentivo que tornou possível a concretização deste trabalho.

Ao Dr. Odair Zenebon, Sra. Maria Auxiliadora Chaves e Sra. Mariangela Tirico Auricchio pelo apoio e incentivo constantes.

À FAPESP pelo suporte material que permitiu a realização deste trabalho.

Aos Laboratórios Darrow S/A pela doação dos frascos de solução fisiológica.

Aos funcionários da Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz pelo fornecimento de meios de cultura.

A Mônica e Carlos Domenech pela análise estatística dos resultados.

A todos que diferentes maneiras apoiaram e colaboraram na execução deste trabalho

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. GENERALIDADES	04
2.2. MÉTODOS DE INOCULAÇÃO	05
2.3. REPRESENTATIVIDADE DA AMOSTRA	08
2.4. CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO	12
2.4.1. MEIOS DE CULTURA	13
2.4.2. TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	16
2.5. VALIDAÇÃO DE PROCESSO ANALÍTICO	18
2.5.1. VALIDAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE	19
2.5.1.1. QUALIFICAÇÃO DAS INSTALAÇÕES	19
2.5.1.2. QUALIFICAÇÃO DOS OPERADORES	27
2.5.1.3. VALIDAÇÃO DO TESTE	30
2.5.1.3.1. CONTROLES NEGATIVOS	30
2.5.1.3.2. CONTROLES POSITIVOS	31
2.6. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	32
2.7. LIBERAÇÃO PARAMÉTRICA	33
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL	36
4.1. AMOSTRAS INTENCIONALMENTE CONTAMINADAS	36
4.2. MICRORGANISMOS DE ESTUDO	36
4.3. MEIOS DE CULTURA	36
4.3.1. MEIO DE CASEÍNA DE SOJA	37
4.3.2. MEIO DE TIOGLICOLATO	37
4.3.3. MEIO SABOURAUD	37
4.3.4. MEIO DE CLAUSEN	38
5. MÉTODOS	39
5.1. QUALIFICAÇÃO DAS INSTALAÇÕES	39
5.2. QUALIFICAÇÃO DO OPERADOR	40

5.3. VALIDAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE	40
5.3.1. CONTROLES NEGATIVOS	40
5.3.2. CONTROLES POSITIVOS	41
5.3.2.1. PREPARAÇÃO DE SUSPENSÃO MICROBIANA	41
5.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS INTENCIONALMENTE CONTAMINADAS	43
5.5. TESTE DE ESTERILIDADE	44
5.5.1. MÉTODOS	44
5.5.2. PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA	45
5.5.2.1. MÉTODO DIRETO	45
5.5.2.2. MÉTODO INDIRETO CONVENCIONAL	46
5.5.2.3. MÉTODO INDIRETO FECHADO	46
5.5.3. TÉCNICA	47
5.5.3.1. MÉTODO DIRETO	47
5.5.3.2. MÉTODO INDIRETO CONVENCIONAL	47
5.5.3.3. MÉTODO INDIRETO FECHADO	49
5.6. CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO E LEITURA DOS RESULTADOS	52
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	53
6. RESULTADOS	54
7. DISCUSSÃO	123
8. CONCLUSÕES	142
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
10. SUMÁRIO	160
11. SUMMARY	161

ÍNDICE DAS TABELAS

TABELA 1	54
TABELA 2	56
TABELA 3	57
TABELA 4	58
TABELA 5	59
TABELA 6	60
TABELA 7	61
TABELA 8	62
TABELA 9	63
TABELA 10	64
TABELA 11	65
TABELA 12	66
TABELA 13	67
TABELA 14	68
TABELA 15	69
TABELA 16	70
TABELA 17	71
TABELA 18	72
TABELA 19	73
TABELA 20	74
TABELA 21	75
TABELA 22	76
TABELA 23	77
TABELA 24	78
TABELA 25	79
TABELA 26	80
TABELA 27	81
TABELA 28	82

TABELA 29 / FIGURA 7	85
TABELA 30 / FIGURA 8	86
TABELA 31 / FIGURA 9	87
TABELA 32 / FIGURA 10	88
TABELA 33 / FIGURA 11	89
TABELA 34 / FIGURA 12	90
TABELA 35 / FIGURA 13	91
TABELA 36 / FIGURA 14	92
TABELA 37 / FIGURA 15	93
TABELA 38 / FIGURA 16	94
TABELA 39 / FIGURA 17	95
TABELA 40 / FIGURA 18	96
TABELA 41	97
TABELA 42	99
TABELA 43 / FIGURA 19	101
TABELA 44 / FIGURA 20	102
TABELA 45 / FIGURA 21	103
TABELA 46 / FIGURA 22	104
TABELA 47 / FIGURA 23	105
TABELA 48 / FIGURA 24	106
TABELA 49 / FIGURA 25	107
TABELA 50 / FIGURA 26	108
TABELA 51 / FIGURA 27	109
TABELA 52 / FIGURA 28	110
TABELA 53 / FIGURA 29	111
TABELA 54 / FIGURA 30	112
TABELA 55 / FIGURA 31	113
TABELA 56 / FIGURA 32	114
TABELA 57 / FIGURA 33	115
TABELA 58 / FIGURA 34	117

TABELA 59 / FIGURA 35 118

TABELA 60 / FIGURA 36 119

TABELA 61 / FIGURA 37 120

TABELA 62 / FIGURA 38 121

TABELA 50 / FIGURA 26 122

1. INTRODUÇÃO

A exigência quanto a níveis de qualidade microbiológica de um produto farmacêutico depende de sua via de administração. O limite microbiano de medicamentos e seus insumos, cosméticos e seus adjuvantes, assim como correlatos pode se constituir em ausência absoluta de formas viáveis ou sua presença em grandezas definidas, restritas ou não a determinadas cepas microbianas.

Verifica-se que produtos contendo contaminantes microbiológicos nem sempre apresentam alterações sensoriais evidentes. Nos adultos saudáveis, o contato com produtos contaminados não representa problema sério a menos que o contaminante seja um microrganismo patogênico. Entretanto, em pacientes com sistema imunológico comprometido, ou se o produto se destinar a tratamento de pele lesada, a uso em membrana mucosa ou olhos ou uso em área normalmente estéril, este contato pode ocasionar infecção.

O risco de infecção associado aos produtos farmacêuticos está vinculado ao uso pretendido. Será menor em produtos que se destinam à administração oral ou aplicação à pele intacta, quando comparado àqueles utilizados em tratamento de pele lesada, membrana mucosa ou olhos, sendo considerável quando em produtos que se destinam a áreas normalmente estéreis do corpo. As ocorrências de infecção mais sérias estão associadas ao uso de produtos injetáveis contaminados, cujas conseqüências podem envolver, em alguns casos, a morte do paciente.

Devido ao risco associado, a característica de esterilidade foi inicialmente requerida em produtos para uso parenteral e mais recentemente a produtos oftálmicos, sendo o conceito de esterilidade definido como a total ausência de formas viáveis capazes de reprodução.

A afirmação sobre a esterilidade absoluta de um produto exigiria que todas as unidades fossem submetidas a teste de esterilidade, o que não é aplicável. Segundo as farmacopéias, a condição de esterilidade de um produto deve ser considerada baseada no conhecimento de que o mesmo tenha sido submetido a condições ideais de processamento e que o resultado do teste de uma amostra representativa, indique a ausência de microrganismos viáveis.

Quando se discutem os aspectos analíticos do teste de esterilidade, observa-se que houve uma evolução na metodologia. Entretanto, existem pontos fundamentais que constituem a limitação deste teste, no que diz respeito à segurança de informações.

Por ser um teste destrutivo, não pode ser aplicado a todo lote e portanto, a falta de certeza absoluta quanto ao estado de esterilidade de todas as unidades pertencentes ao lote é uma limitação estatística do teste, razão pela qual o critério de amostragem é extremamente importante. A retirada de amostras a serem submetidas ao teste deve estar relacionada com a fase de processamento, visto que este complementa as informações sobre a perfeita execução de cada processo operacional esterilizante e/ou manipulação asséptica do produto.

Outras limitações técnicas persistem, pois a própria metodologia, empregada para evidenciar a presença de contaminante viável é falha por não propiciar abrangência necessária quanto ao crescimento de todos os tipos de microrganismos, propiciando condições ao desenvolvimento de bactérias, bolores e leveduras, mas não abrangendo condições que permitem o desenvolvimento de vírus.

A exigência dos microrganismos, quanto à diversificação dos nutrientes, pode não se fazer cumprir através de dois ou três tipos de meios de cultura empregados no teste. Além disso, as temperaturas de incubação

preconizadas podem influenciar a detecção de contaminantes microbiológicos, uma vez que não permite detectar desde psicrofílos até termófilos.

O teste de esterilidade falha em não incorporar algum mecanismo de recuperação para células microbianas agredidas de forma sub-letal devido a exposição aos efeitos de compostos antimicrobianos e/ou a processos de aquecimento, porém permite tempo para sua recuperação.

Em função destas limitações, dá-se muita importância às Boas Práticas de Fabricação, com critérios especiais para produção de medicamentos estéreis. Diversos aspectos, sejam no âmbito produtivo ou analítico, mostram que o controle dos produtos estéreis deve ter início com a avaliação das matérias-primas, do processo, ambiente e equipamento, de forma a permitir que se assegure condições de reduzido potencial de falha, o que será então detectado num sistema analítico validado e bem executado.

No aspecto analítico, um resultado incorreto de um teste de esterilidade apresenta sérias implicações seja envolvendo risco do consumidor, ao se liberar um lote com resultado falso-negativo ou envolvendo risco do produtor, ao se rejeitar um lote estéril que tenha evidenciado resultado falso-positivo.

Em alguns países verifica-se a possibilidade de liberação paramétrica, que considera a decisão de aprova-rejeita do lote tendo por base o processo produtivo, que deve atender a critérios de validação com níveis de rigidez bastante elevados. No entanto, inexistente na legislação brasileira qualquer abertura para a liberação paramétrica, devendo sempre a aprovação quanto à esterilidade do lote preceder a sua liberação. É portanto, de extrema importância o uso de métodos validados, que demonstrem as características de exatidão, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, e que incluam etapas de qualificação da instalação, operacional e de desempenho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES

Os produtos farmacêuticos requerem características especiais de qualidade, definidas de acordo com sua forma farmacêutica e via de administração, de forma a garantir seu uso seguro. Em alguns tipos de produtos, como medicamentos de administração parenteral ou aqueles oftálmicos, assim como alguns correlatos, devido ao risco envolvido, a característica de esterilidade é um indicador crítico de qualidade, uma vez que a presença de qualquer microrganismo vivo pode potencialmente causar sérios danos aos pacientes.

O conceito de esterilidade é definido como a completa ausência de microrganismos viáveis, que apresentem capacidade de desenvolvimento e multiplicação quando em condições favoráveis. Segundo as farmacopéias, a esterilidade de um produto depende das condições do processo produtivo e deve ser confirmada submetendo ao teste de esterilidade uma amostra representativa do produto, que indique a ausência de microrganismos viáveis ^(3,6,14,17,19,21,25,29,46,64,92,104,106,107).

O teste de esterilidade tem por finalidade o contato do produto com o meio de cultura, de forma a permitir detecção da presença de microrganismos viáveis em produtos que tenham sido submetidos a algum processo de esterilização, durante o ciclo de fabricação. A incubação do produto em meios de cultura nutritiva, deverá permitir o crescimento de bactérias, bolores e leveduras. Generaliza-se como ausência de vírus no produto quando aqueles microrganismos estão ausentes, apesar da metodologia empregada não ser abrangente para sua constatação ^(21,25,27,28,46,48,65,92,104,106).

O primeiro método foi oficializado em farmacopéias em 1932, na Inglaterra, pela *British Pharmacopoeia* 32. Em 1936, a *United States Pharmacopeia* XI (USP XI) ⁽⁹⁹⁾ adotou a mesma metodologia, a qual sofreu inovações posteriores, sendo que no fim da década de 60 ocorreu a introdução do método indireto ^(25,75, 107).

A evolução da metodologia é resultado de uma preocupação inerente à melhoria do teste de esterilidade, visando verificar com mais segurança a qualidade do processo de esterilização empregado durante a fabricação de produtos farmacêuticos estéreis, bem como manipulações assépticas.

2.2. MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

Duas possibilidades de inoculação da amostra ao meio de cultura podem ser adotadas, a inoculação direta e a indireta ^(3,25,28,46,48,65,106). O emprego de uma ou outra técnica é determinado por diversos fatores, como natureza da amostra, facilidade na execução da técnica, disponibilidade circunstancial e limitações de ordem econômica.

O método empregando a inoculação direta é utilizado desde a oficialização do teste de esterilidade, em 1932 pela *British Pharmacopoeia* 32 ^(25,34,107). Consiste na transferência de massas ou volumes preestabelecidos da amostra para meios de cultura apropriados. No caso de amostras líquidas, a transferência pode ser por meio de pipetas, seringas ou serem vertidas diretamente no meio de cultura. No caso de amostras sólidas, a transferência pode ser por meio de espátulas com volumes padronizados ou por adição prévia de diluentes estéreis, com posterior transferência da solução ou suspensão resultante.

Como o produto é colocado em contato com o meio de cultura, a presença de substâncias antimicrobianas – antibióticos e conservantes –

pode provocar resultados falso-negativos, impedindo o crescimento de microrganismos contaminantes eventualmente presentes. Assim, conforme a natureza do produto, exige-se a inativação dos agentes inibitórios através de recursos intermediários, como ^(3,28,46,48,65,79,106).

- ❖ Diluição prévia do produto até que a concentração do agente inibidor no meio de cultura seja inferior à concentração mínima inibitória – menor concentração do agente capaz de impedir o crescimento microbiano – e não interfira sobre o crescimento dos microrganismos contaminantes.
- ❖ Adição de agentes inativadores específicos, como por exemplo, a beta-lactamase, que inativam penicilinas e cefalosporinas devido a quebra do anel beta lactâmico; cloreto férrico para inativar substâncias fenólicas; cloreto de sódio e ácido ascórbico para inativar neomicina; ácido p-amino benzóico para inativar sulfonamidas; polissorbato 80 para inativar sais de amônio quaternário e substâncias tiólicas para inativar conservantes mercuriais.

O método empregando a inoculação indireta, ou método por filtração, foi introduzido em 1963 na *British Pharmacopoeia*, oficializado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) em 1964 e na USP XVIII em 1970 ^(25,103,107), tendo sido aplicado inicialmente para substâncias antibióticas, principalmente aquelas que não podiam ser inativadas para serem submetidas ao teste por inoculação direta ^(3,9,25,78,79).

Baseia-se na passagem de uma amostra líquida através de filtro de membrana estéril, então seccionado e transferido assepticamente para meios de cultura apropriados ^(9,34,46,48,65,106).

O filtro de membrana deve possuir uma porosidade nominal de $(0,45 \pm 0,02) \mu\text{m}$, 47 mm de diâmetro, com bordas hidrofóbicas e permitir um fluxo de 55 a 75 ml de água por minuto, à pressão de 70 cm Hg. O material da membrana deve ser escolhido com base no produto a ser testado, apresentando baixa afinidade pelos agentes antimicrobianos eventualmente presentes. Membranas compostas por ésteres de celulose são as mais comumente usadas. Nas situações onde o agente antimicrobiano não pode ser inativado ou quando a quantidade residual for grande, utilizam-se membranas de polivinilideno ou policarbonato ^(3,75,78,79,82,108).

Os sistemas filtrantes devem permitir a manipulação asséptica da membrana, e são em geral compostos de materiais que permitam sua esterilização por autoclavação. O filtro de membrana é colocado sobre um suporte, o sistema filtrante é montado e acoplado a uma bomba de vácuo. Após a filtração do produto ser realizada, a membrana é lavada, empregando-se para isto a passagem de volumes adequados de solução de lavagem com a finalidade de retirar resíduos do produto que eventualmente permaneçam sobre a membrana. O tipo de solução de lavagem depende do produto, sendo mais comumente utilizados água estéril, solução fisiológica ou solução peptonada a 0,1%, podendo ou não conter inativadores específicos. A membrana é a seguir seccionada e transferida para os meios de cultura apropriados ^(3,34,46,48,65,78,79,106).

Como o produto não entra em contato direto com os meios de cultura, diminui a preocupação relativa aos agentes inibidores presentes na amostra, constituindo-se em vantagem em relação à metodologia empregando a inoculação direta ^(3,9,78,79,107).

No entanto, por exigir múltiplas manipulações da amostra e da membrana, o método empregando a inoculação indireta exige maior treinamento técnico e é mais susceptível à contaminação acidental e, portanto, à ocorrência de resultados falso-positivos ^(34,46,48,53,79,106).

Com o objetivo de minimizar a ocorrência de contaminação ambiental e obter maior facilidade operacional, foram desenvolvidos em 1973 sistemas fechados para filtração. Avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de unidades filtrantes que servem tanto como um sistema de filtração como tubos de incubação. O Steritest[®] é um exemplo de sistema fechado para teste de esterilidade de produtos farmacêuticos, baseado no método de filtração por membrana. Neste sistema, a amostra é bombeada de sua embalagem para as unidades filtrantes. A amostra é filtrada através de membrana na base da unidade filtrante por meio de uma bomba peristáltica, sob pressão positiva. Após a filtração do produto, a membrana é lavada com porções adequadas de líquido de lavagem, transferidas da mesma maneira que a amostra. A base da unidade filtrante, por onde o filtrado passa, é fechada e a unidade filtrante é preenchida com meio de cultura. A unidade filtrante é selada e incubada ^(3,34,53,75,107).

Nestes tipos de sistema, não ocorre manipulação da membrana e as amostras, solução de lavagem e meios de cultura não são expostos ou são minimamente expostos ao ambiente, diminuindo os riscos de contaminação acidental e, portanto, de resultados falso-positivos ^(3,34,53,75,107).

2.3. REPRESENTATIVIDADE DA AMOSTRA

Um aspecto bastante discutido é a representatividade da amostra, fundamental na extrapolação do resultado de um teste de esterilidade a todo o lote.

Por ser um teste destrutivo, apenas uma porção significativa do lote é submetida ao teste e, os resultados obtidos, extrapolados às demais unidades. A análise final é, portanto estatística, onde se determina a probabilidade com que as unidades restantes poderiam passar ou falhar no teste. A probabilidade de rejeição de um lote baseada no teste de

esterilidade depende do nível de contaminação, do número de unidades contaminadas e do número de unidades submetidas ao teste, pois quanto maior o número de unidades testadas e maior for o volume de cada unidade submetido ao teste, maior é a probabilidade em detectar contaminantes que estejam presentes ^(25,29,91).

A relação entre o nível de contaminação e a probabilidade de rejeição de um lote é dada pela fórmula ^(29,86,107)

$$p = [1 - (1 - x)^N]$$

Onde, p = probabilidade de rejeição do lote

x = nível de contaminação do lote

N = número de amostras examinadas

O teste de esterilidade pode detectar facilmente altos níveis de contaminação. No entanto, sua capacidade em detectar baixos níveis de contaminação é limitada, a menos que o número de unidades testadas seja muito grande ^(10,21,38,54,80,86,91).

A Figura 1 mostra a probabilidade de aceitação de um lote, de acordo com o nível de contaminação e o número de unidades submetidas ao teste de esterilidade.

FIGURA 1- Probabilidade de aceitação em testes de esterilidade baseada no grau de contaminação e no número de unidades submetidas ao teste⁽⁹²⁾

A probabilidade de aceitação de um lote contendo 1% de unidades contaminadas em um teste de esterilidade, executado sobre 20 unidades, é de 82%. Se o lote apresentar um nível de contaminação de 10%, então, a probabilidade de aceitação em um teste de esterilidade, executado sobre 20 unidades, é de 15%. Verifica-se, assim, que o teste de esterilidade pode detectar facilmente altos níveis de contaminação. O aumento do número de unidades submetidas ao teste de esterilidade aumenta sua sensibilidade, diminuindo a probabilidade de aceitação de lotes contendo baixo nível de contaminação. Um teste de esterilidade executado sobre 20 unidades de um lote com 1% de contaminação apresenta 82% de probabilidade de aceitação, ao passo que quando executado sobre 300 unidades deste mesmo lote, a probabilidade de aceitação passa a ser 5%^(38,53,54,62,86,92).

Assim, o resultado de um teste de esterilidade negativo, indica que a probabilidade de presença de unidades contaminadas na porção não testada é menor que o nível detectável pelo plano de amostragem empregado. Nenhum plano de amostragem aplicado a um teste de esterilidade é capaz de demonstrar com completa segurança que todas as unidades não testadas estejam de fato estéreis ^(86,91,92,104,106).

As farmacopéias indicam, no geral, que o teste de esterilidade deva ser efetuado empregando-se de 10 a 20 unidades, sendo que as alíquotas transferidas para os meios de cultura dependem do método utilizado e do volume das unidades individuais da amostra (QUADRO 1) ^(9,28,46,48,65,106).

QUADRO 1 – Alíquotas a serem transferidas para os meios de cultura de acordo com o método de inoculação utilizado e volume das unidades individuais da amostra no teste de esterilidade ^(9,28,46,48,65,106)

NÚMERO DE ITENS TESTADOS	VOLUME DE CADA UNIDADE (mL)	ALÍQUOTA A SER TRANSFERIDA DE CADA UNIDADE		VOLUME DE MEIO DE CULTURA (mL)	
		Método DIRETO	Método INDIRETO	Método DIRETO	Método INDIRETO
20	Menor que 1	Todo conteúdo	Todo conteúdo	15	100
20	01 a 10	01 mL	Todo conteúdo	15	100
20	10 a 50	05 mL	Todo conteúdo	40	100
20	50 a 100	10 mL	Todo conteúdo	80	100
10	100 a 500	-----	Todo conteúdo	-----	100
10	Maior que 500	-----	Mínimo 500 mL	-----	100

Assim, de produtos com até 10 mL, são transferidas alíquotas de 1,0 mL para 15 mL de meio de cultura quando testados pelo método empregando a inoculação direta, ao passo que quando submetidos ao método empregando inoculação indireta, todo o conteúdo das unidades é testado. Portanto, o método empregando inoculação direta apresenta baixa validade estatística em relação ao método empregando inoculação indireta, pois além da amostragem feita em termos de 20 unidades ainda há a restrição quanto ao volume a ser utilizado de cada unidade – ao contrário do método empregando a inoculação indireta que permite testar grandes volumes e ocasionalmente todo o conteúdo dos injetáveis. Além da vantagem se ser mais representativo estatisticamente, o método empregando a inoculação indireta apresenta vantagem econômica quanto ao consumo de meios de cultura, pois são utilizados dois tubos ou frascos de cada meio de cultura com volume de 100 mL, enquanto que no método empregando inoculação direta são utilizados de 20 a 40 tubos de cada meio de cultura.

Reconhece-se a limitação estatística imposta ao teste de esterilidade devido ao número de unidades testadas ser insuficiente para detectar contaminação presente em poucas unidades do lote. No entanto, esta limitação inerente é aceita, uma vez que o aumento do número de unidades a serem testadas não é uma alternativa economicamente viável e que não se ofereçam alternativas não destrutivas para assegurar a qualidade microbiológica de todas as unidades de um lote⁽⁹¹⁾.

2.4. CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

Embora a representatividade da amostra seja importante para a determinação da sensibilidade do teste de esterilidade, as condições de incubação podem influenciar os resultados. A falta de conhecimento prévio

do tipo de contaminante eventualmente presente no produto torna importante que sejam oferecidas condições ideais para a multiplicação de microrganismos, com as mais diversas exigências de crescimento ^(1,21). As condições de incubação englobam, na dependência dos meios de cultura, temperatura, além de tempo definido.

2.4.1. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura empregados devem fornecer nutrientes necessários para o desenvolvimento de microrganismos eventualmente presentes, condições apropriadas de pH e substâncias que neutralizem produtos de metabolismo, que quando acumulados podem limitar o desenvolvimento microbiano. A concentração de cada componente do meio de cultura deve ser adequadamente balanceada, não sendo tão baixa que limite o desenvolvimento populacional e nem tão alta que possa inibir o crescimento microbiano ^(18,25,41,90,98).

Atualmente, as diversas farmacopéias preconizam a utilização de meios de cultura líquidos, que permitam o desenvolvimento de bactérias e fungos, sendo que a recomendação mínima é o emprego de pelo menos dois tipos de meios de cultura ^(1,25,28,29,37,46,48,65,89,106).

Desde a introdução oficial da metodologia, em 1932, pela *Bristish Pharmacopoeia* 32, diversos meios de cultura foram propostos e adotados, sempre procurando oferecer condições que abrangessem o crescimento do maior número possível de contaminantes ⁽²⁵⁾.

Inicialmente utilizou-se caldo peptonado como meio de cultura, com vistas à detecção de bactérias aeróbias ⁽⁹⁹⁾. Em 1942, com a exigência da constatação da presença de bactérias anaeróbias, a USP XII ⁽¹⁰⁰⁾ adotou a utilização de caldo peptonado adicionado de gelatina a 2%, para dificultar a

difusão do oxigênio no interior do meio de cultura e possibilitar condições de anaerobiose e solução de Litmus, como indicador de oxi-redução. A partir de 1947, a USP XIII ⁽¹⁰¹⁾ adotou o caldo de tioglicolato, também denominado de meio Brewer modificado, recomendado por permitir obter condições de aerobiose e anaerobiose em um mesmo tubo, apresentando em sua constituição ágar bacteriológico, na concentração de 0,05 a 0,075% para dificultar a difusão do oxigênio; cisteína e tioglicolato como agentes redutores, que reagem com o oxigênio, retirando-o do meio; e a resazurina como indicador de oxi-redução, que forma um anel de cor característica na superfície do meio, indicando a região em contato com o oxigênio. Além de permitir a pesquisa de contaminantes anaeróbios, o meio de tioglicolato tem a capacidade de neutralizar a ação bacteriostática de conservantes mercuriais ^(1,25,37).

Embora largamente utilizado, alguns estudos que sugerem que o meio de tioglicolato pode inibir o crescimento de algumas cepas de *Bacillus* e *Clostridium*, propondo sua substituição pelo meio de Clausen ^(1,25,37). O meio de Clausen apresenta uma associação de ditionito de sódio e tioglicolato, que elimina a ação inibitória exercida pelo tioglicolato e aumenta sua estabilidade, permitindo a manutenção de sua viabilidade por tempo superior, quando mantido sob refrigeração ^(25,37).

A busca da constatação da presença de bolores e leveduras em produtos estéreis teve início em 1942, quando a USP XII ⁽¹⁰⁰⁾ introduziu o meio contendo mel. Em 1950, a USP XIV ⁽¹⁰²⁾ passa a adotar o caldo Sabouraud e em 1970, a USP XVIII ⁽¹⁰³⁾ introduziu, em substituição, o caldo de caseína de soja, que permite crescimento de bactérias aeróbias, bolores e leveduras ^(1,25,26,74,76). Porém, no que diz respeito a seletividade para com bolores e leveduras o uso do meio de caseína de soja é questionável, visto que valores de pH ótimos para crescimento de fungos são da ordem de 5 a 7 ou ainda mais baixos, enquanto que o pH deste meio é de aproximadamente 7,3 ^(18,25,26,90,98).

Os meios de cultura utilizados no teste de esterilidade devem ser controlados quanto sua esterilidade – de forma a conferir segurança quanto à ausência de resultados falso-positivos no teste – e sua capacidade em promover o crescimento da maior variedade microbiana, mesmo que em número muito pequeno, e evitar a ocorrência de resultados falso-negativos. Estas características dos meios de cultura devem ser verificadas para cada lote do mesmo ^(3,27,28,46,48,52,65,87,92,106).

Para a constatação da capacidade promotora do crescimento, as farmacopéias recomendam a inoculação, nos meios de cultura, de uma suspensão contendo de 10 a 100 microrganismos viáveis, sendo que após incubação a condições apropriadas devem apresentar crescimento considerável ^(20,27,28,35,46,48,52,57,65,87,89,92,106). Para esta constatação, as farmacopéias Americana ⁽¹⁰⁶⁾ e Européia ⁽⁴⁶⁾ recomendam o uso de cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 ou ATCC 6538P), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 ou ATCC 19404), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404). A Farmacopéia Japonesa ⁽⁶⁵⁾ recomenda o uso das seguintes cepas: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) e *Candida albicans* (ATCC 10231), sendo alternativamente utilizadas cepas de *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437) e *Micrococcus luteus* (ATCC 9341). Todas as farmacopéias indicam que podem ser adotados microrganismos adicionais, quando detectados de forma típica nos produtos ou no ambiente produtivo ^(28,46,48,57,65,106). Alguns estudos indicam a utilização de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9736) e *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), por tratarem-se de cepas de microrganismos não patogênicos ⁽³²⁾.

2.4.2. TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

Durante o período de incubação, além de fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos microrganismos eventualmente presentes, é preciso promover condições adequadas em termos de temperatura e tempo ^(18,21,29,41,90,98).

A temperatura influencia a absorção de nutrientes, o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos. Cada microrganismo apresenta características específicas quanto à ^(18,77,90,98).

- ❖ Temperatura mínima, abaixo da qual o crescimento não ocorre;
- ❖ Temperatura ótima de crescimento, onde as multiplicações celulares estão na máxima velocidade;
- ❖ Temperatura máxima, acima da qual não é mais possível o crescimento, provavelmente devido desnaturação de macromoléculas.

A influência da temperatura sobre o crescimento microbiano pode ser verificada considerando-se o tempo de geração, isto é, o tempo necessário para uma célula dar origem a duas. Por exemplo, o aumento da temperatura até 40 °C promove uma diminuição do tempo necessário para ocorrer duplicação celular de *Escherichia coli* e a partir de 45 °C, o tempo de geração aumenta, provavelmente devido a proximidade da temperatura máxima de crescimento do microrganismo ⁽¹⁸⁾.

Os microrganismos podem ser classificados, de acordo com sua temperatura ótima de crescimento, em três grupos ^(18,90,98):

- ❖ Quando apresentam temperaturas ótimas de crescimento abaixo de 20 °C, são classificados como psicrófilos;
- ❖ Quando apresentam temperaturas ótimas entre 20 °C e 40 °C, são classificados como mesófilos;
- ❖ Quando se desenvolvem melhor a temperaturas superiores a 40 °C, são classificados como termófilos.

Sabe-se que a maioria dos microrganismos conhecidos como contaminantes de produtos farmacêuticos são mesófilos, com mínima probabilidade de serem termófilos e por esta razão, as diferentes farmacopéias preconizam, para testes de esterilidade, o uso de duas condições de temperatura ^(25,27,28,46,48,52,65,87,89,91,92,106,113).

- ❖ Para a detecção de bactérias, o meio de tioglicolato é incubado a temperaturas entre 30 °C a 35 °C;
- ❖ Para a detecção de fungos e bactérias, o meio de caseína de soja é incubado a temperaturas entre 20 °C e 25 °C.

Com relação ao tempo de incubação, no decorrer da evolução dos testes de esterilidade, foram adotados períodos de incubação de 5, 7, 10 e 14 dias. Considerando-se que os microrganismos contaminantes encontram, no produto farmacêutico, condições adversas e, muitas vezes, mantém sua viabilidade sob a forma esporulada, o período de incubação deve levar em consideração o tempo para que estes contaminantes se recuperem e se multipliquem a níveis detectáveis ^(21,29,33,41,52). A maioria das farmacopéias recomenda um período de incubação de 7 ou 14 dias, dependendo do método empregado para o teste de esterilidade. Para métodos empregando inoculação direta, alguns compêndios recomendam período de incubação de 14 dias enquanto que para métodos empregando inoculação indireta, 7 dias

(9,21,27,28,46,48,65,105). A farmacopéia americana, em sua última edição ⁽¹⁰⁶⁾, passa a adotar um período de 14 dias de incubação independente da metodologia empregada. De modo geral, as farmacopéias aconselham o uso de períodos de incubação maiores que os preconizados, como forma de aumentar a sensibilidade do teste, permitindo o desenvolvimento de microrganismos que apresentem crescimento mais lento (28,29,33,46,48,52,65,92,105,113).

2.5. VALIDAÇÃO DE PROCESSO ANALÍTICO

A validação é necessária para assegurar a qualidade, segurança e eficiência de processos analíticos.

Vários incidentes ocorridos nos anos 70 como, por exemplo, a constatação de grande número de casos de septicemia e óbito devido ao uso de parenterais cuja contaminação não foi detectada com o teste de esterilidade, demonstraram que somente os testes no produto final não eram suficientes para garantir a qualidade, a segurança e a eficiência do produto. A partir de então, a validação, inclusive nos processos produtivos, passou a ser exigida ^(17,50,54,112).

A validação reordena conceitos tornando o teste no produto final como confirmatório e não o fator determinante da qualidade ^(7,54,89). Faz parte da evolução do conceito de qualidade, onde a prevenção tornou-se primordial e economicamente mais interessante.

Validação de métodos analíticos é o processo pelo qual se estabelece, por meio de estudos laboratoriais, que qualquer material, processo, procedimento, atividade, equipamento ou mecanismo utilizado no controle irá alcançar, com alto grau de confiança, os resultados esperados. Os parâmetros que devem ser enfocados na validação de metodologias

analíticas dependem do quanto afetam a qualidade do resultado (2,4,7,8,27,51,54,63,93,94,105).

2.5.1. VALIDAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE

Devido às limitações estatísticas do teste de esterilidade, torna-se imprescindível o uso de métodos validados, que demonstrem as características de sensibilidade, especificidade, exatidão e reprodutibilidade.

Os parâmetros que devem ser enfocados para a validação do teste de esterilidade são aqueles relacionados com (2,4,10,30,49,50,51,54,57,59,87,91,93,96,105,107).

- ❖ Qualificação das instalações;
- ❖ Qualificação dos operadores;
- ❖ Validação do teste propriamente dita - com o uso de controles negativos e positivos.

A validação do teste de esterilidade deve permitir obter reduzido potencial de falha, uma vez que um resultado incorreto no teste de esterilidade implica tanto em risco de aceitação de um lote contaminado devido a ocorrência de resultados falso-negativos, como em risco de rejeição de um lote estéril devido a ocorrência de resultados falso-positivos.

2.5.1.1. QUALIFICAÇÃO DAS INSTALAÇÕES

Por instalações, entende-se os equipamentos e o ambiente onde o teste será executado (59,63,96).

Qualificação é o processo pelo qual se demonstra, de forma sistemática e documentada, que todos os equipamentos envolvidos em qualquer etapa do teste de esterilidade estão devidamente instalados, adequadamente mantidos e operando conforme especificações, garantindo que os testes estejam sendo desenvolvidos obedecendo-se as condições preconizadas. A qualificação das instalações é tanto um pré-requisito como parte integrante no processo de validação e a requalificação deve ser feita em intervalos pré-determinados ^(27,59,63,94).

O ambiente necessita de contínuo controle com a finalidade de reduzir ao mínimo a quantidade de partículas existentes na área, evitando a contaminação da amostra durante sua exposição ao ambiente externo e garantindo a validade do teste de esterilidade ^(25,27,31,49,56,57,63,66,71,81,84,92,96,109).

Para a indústria farmacêutica, o conceito de ambiente puro engloba tanto o controle do número de partículas não viáveis, de natureza orgânica ou inorgânica existentes na área, como o controle de partículas viáveis, representadas pelos microrganismos. Existe uma relação entre o número de partículas na área e a carga microbiana existente, uma vez que a maior parte dos microrganismos é transportada sobre as partículas e disseminada no movimento turbulento da área. Esta relação não é fixa e depende de vários fatores, em particular do tipo de trabalho executado ^(5,31,49,56,66,71,96,109).

Os testes de esterilidade são executados em ambientes controlados, denominados de salas biolimpas, que tem por finalidade proporcionar uma atmosfera ideal, que irá proteger o produto durante sua exposição ao ambiente ^(25,63,66,68,71,85,87,109).

Em geral, consiste de uma sala pequena, provida de antecâmara, projetada para facilitar a limpeza e evitar depósito de partículas e contaminantes, como arredondamento dos cantos, portas desmontáveis,

tubulações embutidas ou em dutos técnicos desmontáveis, visores e luminárias faceando as paredes ^(11,66,73,85,87).

O revestimento de paredes, de pisos, de forros e de outros componentes de uma sala biolimpa não pode ser poroso e nem gerador de partículas, deve apresentar superfícies lisas, isentas de saliências e reentrâncias, laváveis e impermeáveis, resistentes à corrosão e aos agentes de limpeza e desinfecção. Normalmente os materiais utilizados no seu revestimento são tinta epóxi ou poliuretano, aço inoxidável, alumínio anodizado, além de laminado melamínico ^(66,73,85,87).

A sala biolimpa deve ser provida de sistema de circulação e tratamento do ar, que assegura a limpeza do ambiente, alimentando a sala com ar filtrado e retirando os contaminantes nela emitidos.

O filtro, principal componente do sistema, assegura que o ar insuflado na sala seja isento de contaminação. Para tanto, são utilizados filtros HEPA – Alta Eficiência de Filtração – cuja eficiência varia de 99,997% para partículas de 0,5 μm a 99,9999% para partículas de 0,12 μm e, quando são necessários níveis mais rígidos, são utilizados filtros ULPA – Ultra Alta Eficiência de Filtração – com eficiência de 99,99999% ^(66,73,85,87).

A distribuição do ar filtrado pode ser feita em três tipos de regime de fluxo ^(49,66,68,70,71,81,85,87,88,96,110).

- ❖ Regime de fluxo unidirecional (laminar) vertical, do teto em direção ao chão, acompanhando o movimento de sedimentação das partículas, utilizado para obter salas de classes de limpeza mais rígidas (1 a 100);
- ❖ Regime de fluxo não unidirecional (turbulento), onde as partículas são espalhadas no ambiente e diluídas no volume de ar circulante,

mantendo a concentração abaixo dos níveis permitidos pelas normas, sendo utilizado para obter salas de classes de limpeza menos rígidas (100 a 10.000).

- ❖ Regime de fluxo misto, constituído de uma porção laminar, imediatamente adjacente ao local de insuflamento, que torna-se em seguida turbulento. Assim como no regime de fluxo não unidirecional, as partículas são espalhadas no ambiente e diluídas no volume de ar circulante.

A circulação do ar é expressa em número de vezes em que o volume de ar da sala é trocado por hora, sendo mais importante no caso de salas de classes mais rígidas. O número de trocas é calculado em função da classe de limpeza desejada, da eficiência dos filtros e da contaminação emitida na sala limpa ^(49,66,71,85,88).

A fim de evitar a entrada de partículas ou contaminantes provenientes de salas vizinhas, adota-se o regime de pressões diferenciais entre salas e entre estas e o ambiente externo, ou seja, pressão positiva a partir da sala mais limpa. Assim ao abrir uma porta ou na existência de frestas e aberturas naturais, a tendência da corrente de ar impede a penetração de elementos indesejáveis ^(66,70,81,87).

Tais ambientes além de terem a quantidade de partículas controladas, devem ter também controladas, a temperatura e a umidade ⁽⁸⁷⁾.

A classificação de salas biolimpas é feita de acordo com diversas normas, entre elas o *Federal Standard 209E*, quanto ao número máximo de partículas não viáveis encontrado em determinado volume de ar, conforme indicado no QUADRO 2 ^(66,71,85,106).

QUADRO 2- Classificação de salas biolimpas, segundo *Federal Standard 209E* ^(66,71,85,106)

CLASSE	Nº DE PARTÍCULAS DE DIÂMETRO ENTRE 0,5 E 5 $\mu\text{m}/\text{pé}^3$ OU m^3			
10.000	10.000 partículas/ pé^3	ou	353.000	partículas/ m^3
1.000	1.000 partículas/ pé^3	ou	35.300	partículas/ m^3
100	100 partículas/ pé^3	ou	3.530	partículas/ m^3
10	10 partículas/ pé^3	ou	353	partículas/ m^3
1	1 partícula/ pé^3	ou	35,3	partículas/ m^3

Assim quanto mais limpa a sala, maior é o rigor no controle do número de partículas em suspensão ⁽¹⁰⁶⁾.

Para fins de teste de esterilidade, são empregadas unidades de fluxo laminar vertical, que devem satisfazer aos requisitos de classe 100 e devem ser mantidas em salas que satisfaçam aos requisitos de classe 1.000 ou classe 10.000. Alguns laboratórios não tomam esta precaução, mantendo as unidades de fluxo laminar em ambiente comum, porém esta situação exige troca de pré-filtros e filtros absolutos com maior frequência em função da saturação mais rápida destes ^(49,57,68,71,87,106).

O controle de sala biolimpa e de unidades de fluxo laminar compreendem as seguintes medições ^(49,57,60,63,66,68,69,71,81,85,95,96,97).

- ❖ Velocidade, vazão e uniformidade do fluxo de ar, para verificar se o sistema de ar está corretamente dimensionado, se o número de trocas de ar ou a velocidade do fluxo unidirecional são atendidos.
- ❖ Vazamentos nos sistemas de filtração, para confirmar a integridade dos filtros HEPA, assegurando que o ar saindo dos filtros está

perfeitamente limpo e que não estão sendo introduzidas partículas pelo sistema.

- ❖ Linearidade do fluxo, para verificar se o ar se desloca em linhas de fluxo paralelas, detectando “pontos cegos” ou turbulências.
- ❖ Pressurização da sala, para verificar se o gradiente de pressão determinado está sendo respeitado, garantindo que a contaminação do exterior não invada a sala pelas frestas naturais.
- ❖ Temperatura e umidade.
- ❖ Contagem do número de partículas existentes na área, efetuada por contadores de partículas com capacidade de contar separadamente as partículas de grandeza entre 0,5 e 5 μm e as maiores de 5 μm .
- ❖ Contagem do número de microrganismos existentes na área, tanto no ar como em superfícies.

Para o monitoramento microbiológico do ar normalmente são utilizados dois métodos, o semi-quantitativo ou monitoramento passivo e o quantitativo ou monitoramento ativo (5,24,49,55,56,63,67,71,74,83,85,87,96,97,106,109,110,111).

O método semi-quantitativo ou monitoramento passivo é um método simples e de baixo custo, que emprega placas de sedimentação, expostas durante as operações, pelo período máximo de 1 hora, na altura de trabalho e que monitoram a contaminação microbiana transportada pelo ar. A desvantagem deste método é não fornecer informações quantitativas sobre o nível de contaminação microbiana no ar, por estar sujeito às variações decorrentes do turbilhonamento de ar resultante do trabalho. Como a velocidade de sedimentação é proporcional ao tamanho das partículas e

sendo a maioria delas menores que 0,5 μm , as placas não contaminadas podem dar uma falsa segurança sobre a qualidade do ar. No entanto, os resultados obtidos podem ser utilizados como valores aproximados da extensão da contaminação do ar bem como para o conhecimento dos tipos de microrganismos presentes ^(24,49,71,83,106,110,111).

O método quantitativo ou monitoramento ativo permite expressar a contaminação em termos comparáveis, ou seja, número de unidades formadoras de colônias (UFC) por unidade de volume de ar amostrado. Este método emprega amostradores de ar, onde um certo volume do ar é atraído por hélices ou por vácuo, é acelerado a alta velocidade e os microrganismos são impactados na superfície de meios de cultura adequados ^(24,71,83,106,110).

Também é possível monitorar a qualidade do ar empregando-se contadores de partículas, que permitem detectar imediatamente flutuações na qualidade do ar, alertando que as condições na sala estão excedendo a limites predeterminados. Seu uso baseia-se na correlação entre o número de partículas viáveis e não viáveis, tendo a vantagem do resultado ser imediato, porque não é necessário o uso de meios de cultura ^(49,69,85).

O monitoramento de superfícies permite avaliar a efetividade dos procedimentos de limpeza e desinfecção, além de avaliar a contaminação causada pelo operador. Podem ser utilizadas as técnicas de *swabbing*, quando se trata de superfícies irregulares ou placas de contato, conhecidas como placas Rodac[®], quando em superfícies planas. Exemplos de superfícies a serem monitoradas incluem teto, paredes, piso, equipamentos, utensílios e pessoal ^(5,11,16,24,42,49,55,57,63,66,83,85,87,106,109).

Todo programa de monitoramento ambiental deve incluir, além da quantificação, a caracterização dos microrganismos isolados. Esta identificação, especialmente de bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas e fungos, pode ser útil na investigação da origem dos

contaminantes nas superfícies ou no ar, principalmente quando são detectados freqüentemente. Análises de tendência devem ser realizadas nos dados de monitoramento ambiental para detectar mudanças nas condições higiênicas ^(5,16,63,83).

Os métodos para identificação podem incluir aspectos morfológicos das colônias, coloração de Gram e aspectos micromorfológicos, testes bioquímicos, uso de kits e reagentes comerciais ou uso de sistemas automatizados de identificação. Independente do método de identificação escolhido, limitações existem quando se trabalha com microrganismos isolados de ambientes. Estes microrganismos podem estar altamente “estressados”, devido a fatores físicos, contato com agentes químicos e/ou térmicos, podendo ser difícil obter reações bioquímicas típicas ^(16,83).

Os ambientes controlados quanto à pureza microbiológica, sejam salas ou unidades de fluxo laminar, devem ser periodicamente limpos e desinfetados, de modo a permitir condições ideais para a execução do teste. A manutenção dos padrões de classificação envolve, entre outros fatores, procedimentos corretos de limpeza e desinfecção, assim como a utilização de produtos e acessórios adequados. As práticas de fumigação ou de pulverização, anteriormente adotadas, são atualmente consideradas inadequadas. Produtos convencionais como formol, álcool, compostos de amônio quaternário, compostos iodados, fenólicos, clorados, assim como ácido paracético, e glutaraldeído são utilizados na desinfecção. Todos apresentam vantagens e desvantagens na sua utilização, tanto relacionadas à ação biocida, como decorrentes de interações ou possíveis ataques às superfícies ^(5,11,16,24,42,49,55,57,63,66,83,85,87,106,109).

2.5.1.2. QUALIFICAÇÃO DOS OPERADORES

O uso de filtros HEPA em unidades de fluxo laminar ou em salas biolimpas não garante a proteção contra contaminação causada por técnicas assépticas inadequadas ^(16,21,23,25,43,49,96). Os operadores devem estar devidamente treinados, tanto na execução das técnicas analíticas, quanto nos procedimentos necessários ao trabalho em salas biolimpas, minimizando a contaminação ^(5,13,16,23,24,25,27,31,43,47,49,57,59,63,66,87,96,97,109).

Verifica-se que os operadores que trabalham em uma sala biolimpa são responsáveis por cerca de 54% das partículas emitidas, tanto partículas viáveis quanto partículas não viáveis. Em média, o ser humano gera de 1500 a 5000 Unidades Formadoras de Colônias/minuto emitidas por meio da fala, espirro, tosse, escamação da pele e do couro cabeludo ^(5,12,13,24,31,40,61,71,95,106,109).

Alguns estudos indicam que os microrganismos detectados em salas biolimpas são principalmente aqueles relacionados com humanos, sendo a maioria bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus* sp e *Micrococcus* sp, normalmente associados a cabelos, pele e trato respiratório e, em algumas ocasiões, bactérias Gram-negativas, principalmente enterobactérias e acinetobacter, relacionados aos hábitos de higiene pessoal ^(12,13,22,23,31,40,49,61,109,112).

Cada indivíduo possui uma flora bacteriana específica em determinadas partes do corpo. O quadro seguinte mostra os resultados de um estudo realizado com 11 homens e 11 mulheres saudáveis, onde se verifica o tipo de flora microbiana encontrada nas diversas partes do corpo, e mostra a importância de medidas de controle na veiculação de contaminantes emitidos pelo operador ⁽⁴⁰⁾.

QUADRO 3 – Relação entre tipo de flora bacteriana e parte do corpo ⁽⁴⁰⁾

ÁREA DO CORPO	FLORA AERÓBIA (UFC)		FLORA ANAERÓBIA (UFC)	
	HOMEM	MULHER	HOMEM	MULHER
Testa	2.075	1.225	8.000	13.500
Esterno	2.125	165	50.000	3.500
Antebraço	250	35	9	13
Palma da mão	98	155	33	85
Dorso do pé	80	122	3	10
Sola do pé	22.750	675	10	4

A flora microbiana dispersa no ambiente depende tanto da bioflora característica do operador e da parte do corpo que esteja envolvida na atividade quanto do grau de atividade exercida ^(12,31,40,49,61,109).

Alguns estudos estabelecem uma correlação entre o movimento dos operadores em salas biolimpas e o número de partículas emitidas no ar, conforme indicado no quadro a seguir ^(24,31,40,49,71,95,109).

QUADRO 4 – Relação entre os movimentos e a o número de partículas emitidas ⁽⁷¹⁾

TIPOS DE MOVIMENTOS	Nº DE PARTÍCULAS $\geq 0,5$ μm EMITIDAS/ MINUTO/ m^3
Repouso	100.000
Sentada, movimentando cabeça, braços e mãos	500.000
Sentada, movimentando a parte inferior ou superior do corpo	1.000.000
Ato de sentar e levantar	2.500.000
Ato de caminhar lentamente	5.000.000
Ato de subir e descer escadas	10.000.000
Exercício físico mais amplo	15.000.000

Considerando-se que em uma sala classe 100, o número de partículas entre 0,5 e 5 μm deve ser inferior a 3.500/m³, é possível perceber que as pessoas constituem-se na maior fonte de contaminação.

Uma medida de controle da emissão de partículas está relacionada à vestimenta, que tem por finalidade evitar que as partículas geradas pelo corpo do operador contaminem o ambiente e a amostra ^(12,23,24,49,57,71,89,110). Possuem características específicas de acordo com o grau requerido da sala biolimpa, relacionadas ao tipo de matéria-prima utilizada na composição do tecido e à maneira como é confeccionada ^(12,24).

Entre as características que um tecido para vestimenta a ser utilizada em sala biolimpa deve contemplar, destacam-se a eficiência de barreira de partículas, permeabilidade ao ar, comportamento anti-estático e resistência aos processos de esterilização ^(12,24,71,89).

A eficiência de barreira contra as partículas está ligada ao tipo de matéria-prima utilizada na confecção do tecido e na maneira como as fibras estão entrelaçadas. Os melhores tecidos para vestimenta de sala biolimpa são os de fibras sintéticas como poliamida, poliéster e polipropileno, porque possuem a propriedade de não soltar fibras, como ocorre com os tecidos de fibras naturais, por exemplo o algodão. Os fios devem ser contínuos e bem entrelaçados, para evitar a presença de aberturas que possibilitem a passagem e o depósito de partículas ^(12,24,71,89).

A vestimenta deve oferecer segurança ao ambiente e ao mesmo tempo conforto e praticidade ao operador, permitindo movimentos livres para reduzir o atrito nas costuras, acabamentos e no tecido. É composta de touca, máscara, macacão, sapatilhas ou botas e luvas, cobrindo a maior parte possível do corpo do operador ^(12,24,49,87).

O treinamento constitui-se em item essencial no controle de contaminação, sendo importante promover envolvimento, comprometimento e domínio sobre as atividades exercidas, assegurando o pleno entendimento da importância sobre a qualidade dos resultados gerados (5,13,16,23,24,25,31,43,47,49,57,59,63,66,87,96,109). O elemento humano deve ser conscientizado sobre a importância do controle de emissão de partículas, sobre o ambiente particular em que trabalha e do comportamento adequado em tal ambiente: seus movimentos devem lentos, uniformes, sistematizados, provocando mínima interferência no fluxo de ar da sala ou da unidade de fluxo laminar e a expressão verbal minimizada (5,23,31,40,49,63,71,87).

A avaliação do treinamento pode ser feita pela investigação quanto ao atendimento aos procedimentos analíticos, a técnicas de vestimenta adequadas, a procedimentos de limpeza e desinfecção, ou adotando testes escritos (5,23,31,40,49,63,71,87).

2.5.1.3. VALIDAÇÃO DO TESTE

A composição dos meios de cultura, as condições de tempo e temperatura de incubação e a eliminação de agentes inibitórios são essenciais para a fidelidade dos resultados de um teste de esterilidade.

2.5.1.3.1. CONTROLES NEGATIVOS

Os controles negativos devem ser executados em qualquer tipo de material envolvido no teste: meios de cultura, diluentes, dispositivos para transferência de amostra, etc. Correspondem à verificação da esterilidade dos materiais utilizados na execução do teste de um produto e destinam-se a evitar a ocorrência de um resultado falso-positivo, ou seja, um produto estéril que venha a ser reprovado devido a crescimento microbiano

proveniente do meio de cultura, por exemplo, e não do produto em teste (3,28,46,48,57,65,87,106).

A verificação da esterilidade dos meios de cultura consiste na pré-incubação de porção representativa, ou de 100% do lote de meio de cultura, por 14 dias, na temperatura preconizada. Considera-se satisfatória, quando não ocorrerem evidências de crescimento microbiano de qualquer natureza (3,28,46,48,87,106).

2.5.1.3.2. CONTROLES POSITIVOS

Os controles positivos são obtidos pela inoculação de 10 a 100 UFC de cepas microbianas aos meios de cultura e aos meios de cultura acrescidos do produto, permitindo verificar tanto a adequação dos meios de cultura em promover o crescimento de microrganismos, como verificar a presença de atividade inibitória do produto sobre o crescimento microbiano e a eficiência do sistema inativador (2,28,46,48,57,65,87,106).

Destinam-se a evitar a ocorrência de um resultado falso-negativo, ou seja, um produto contaminado ser considerado estéril pelo fato do meio de cultura não permitir o desenvolvimento dos contaminantes, ou devido à presença de substâncias inibidoras do crescimento que não foram adequadamente inativadas.

Os microrganismos normalmente utilizados nos controles positivos são cepas constituídas por bactérias, bolores e leveduras, normalmente encontradas como contaminantes de produtos farmacêuticos e que apresentam características específicas para o desafio do meio de cultura e dos sistemas de inativação de antimicrobianos (28,46,48,65,87,106).

2.6. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O resultado do teste de esterilidade, desde sua oficialização, foi fundamentado em observação macroscópica do crescimento microbiano, manifestado sob diferentes formas no meio líquido ^(14,15,27,28,38,46,48,52,65,106). O crescimento pode ser visualizado pela formação de aglomerados das colônias, pela formação de películas na superfície do meio, pela presença de sedimentos depositados, pela turvação do meio de cultura ou pela presença de fibras – soltas ou enoveladas como algodão – caracterizando as hifas dos bolores. Qualquer evidência de crescimento microbiano pode ser verificada por subcultura em meio sólido e os microrganismos, identificados até, pelo menos, o nível de gênero e preferencialmente, até nível de espécie.

No primeiro estágio, se nenhum crescimento microbiano for observado, a amostra está considerada satisfatória para ao teste de esterilidade. Se for observado crescimento microbiano e a revisão dos procedimentos realizados no teste de esterilidade indicar falha ou uso de técnicas assépticas inadequadas, o primeiro estágio é declarado inválido e deve ser repetido, utilizando-se mesmo número de unidades. Se na repetição do primeiro estágio não for observada evidência de crescimento, a amostra está considerada satisfatória.

Se, no primeiro estágio, for observado crescimento microbiano e a revisão dos procedimentos realizados no teste de esterilidade não indicar falha ou uso de técnicas assépticas inadequadas, é efetuado o segundo estágio, onde o número de unidades deve ser o dobro da quantidade anteriormente testada. O segundo estágio também deve ser efetuado se na repetição do primeiro estágio for observado crescimento microbiano.

No segundo estágio, se não for observada evidência de crescimento microbiano, a amostra será considerada satisfatória. Se for observado crescimento microbiano e a revisão dos procedimentos realizados no teste

de esterilidade não indicar falha ou uso de técnicas assépticas inadequadas, a amostra será considerada insatisfatória para o teste. No entanto, se houverem evidências de falha durante o procedimento ou de uso de técnicas inadequadas, este segundo teste pode ser repetido.

Conforme anteriormente citado, há 18% de chance de que um lote contendo 1% de unidades contaminadas seja reprovado no teste de esterilidade efetuado sobre 20 unidades. Sendo efetuado um reteste a probabilidade de rejeição deste lote passa de 18% para 3,2% e, portanto aumenta a probabilidade de aceitação do lote contaminado ⁽²⁹⁾.

2.7. LIBERAÇÃO PARAMÉTRICA

Devido às limitações estatísticas do teste de esterilidade, este não pode ser considerado como única ferramenta para determinar a qualidade microbiológica de um produto estéril ^(19,36,38,91). Na verdade, a garantia da esterilidade de um produto deve ser baseada na documentação de produção e nos dados de esterilização referentes ao lote. Estes dados devem estar baseados em procedimentos de validação que demonstrem a capacidade do processo de esterilização em inativar totalmente a contaminação intrínseca do produto ou de algum contaminante de maior resistência, ou ainda de remover a contaminação intrínseca e garantir que todos os passos envolvidos no processo sejam realizados de maneira asséptica, prevenindo qualquer contaminação. Juntamente com o teste de esterilidade do produto final, tais controles fornecem a máxima segurança quanto à esterilidade do produto.

Por estar baseado em amostragem estatística, o resultado de um teste de esterilidade tem sido alvo de controvérsias na indústria farmacêutica. Embora não seja recomendação de compêndios oficiais, alguns autores ^(19,36,80,86) vêem a possibilidade de liberação de um produto

para comercialização sem que seja feito o teste de esterilidade no produto final, baseando-se nos parâmetros de esterilização. Tal procedimento é chamado de liberação paramétrica. Normas aplicáveis a procedimentos de validação apresentam critérios mais rígidos, por vezes pouco factíveis, quando da intenção de liberação paramétrica.

A liberação paramétrica tem sido garantida para alguns fabricantes nos países nórdicos, que demonstraram garantia de esterilidade através de controles de processo, uso de processos validados e observância das normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Em outros países, como nos da América Latina, Estados Unidos e Europa, utilizam-se controles de processo e validação aliados ao teste de esterilidade no produto final para a liberação de produtos para comercialização ^(19,36,80,86).

3. OBJETIVOS

O estudo proposto teve por finalidade:

- a) Estudar, comparativamente, a eficiência de detecção de três métodos de teste de esterilidade – empregando inoculação direta, inoculação indireta nos moldes convencionais e inoculação indireta em sistema fechado (Steritest[®]);
- b) Investigar os benefícios da ampliação do tempo de incubação e da utilização de diferentes temperaturas de incubação (12, 22, 32 e 42 °C) e tipos de meios de cultura;
- c) Investigar a importância da inclusão de diferentes cepas de microrganismos como controles positivos.

4. MATERIAL

4.1. AMOSTRAS INTENCIONALMENTE CONTAMINADAS

O material objeto de estudo foi constituído de frascos plásticos contendo solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, com volume de 10 mL, cedidos pelo produtor, de lote único, contaminadas com cargas microbianas mínimas de distintas cepas microbianas, representativas dos microrganismos de estudo (5 UFC, 10 UFC e 50 UFC por unidade), que representaram as amostras empregadas nos distintos testes de esterilidade .

4.2. MICRORGANISMOS DE ESTUDO

Os microrganismos utilizados foram cepas de *Aspergillus niger* (ATCC 16404), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC10231), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9736) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

4.3. MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura avaliados comparativamente neste estudo foram:

4.3.1. MEIO DE CASEÍNA-SOJA

Digesto pancreático de caseína		17,0 g
Digesto papaínico de farinha de soja		3,0 g
Cloreto de sódio		5,0 g
Fosfato de potássio dibásico		2,5 g
Dextrose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)		2,5 g
Água	qsp	1000 mL
pH após esterilização: 7,3 ± 0,2		

4.3.2. MEIO DE TIOGLICOLATO

L-Cistina		0,5 g
Cloreto de sódio		2,5 g
Dextrose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)		5,5 g
Ágar granulado (umidade não maior que 15%)		0,75 g
Extrato de levedura (solúvel em água)		5,0 g
Digesto pancreático de caseína		15,0 g
Tioglicolato de sódio	ou	0,5 g
Ácido tioglicólico		0,3 mL
Solução de resazurina sódica (1:1000), recém preparada		1,0 mL
Água	qsp	1000 mL
pH após esterilização: 7,1 ± 0,2		

4.3.3. MEIO SABOURAUD ⁽¹⁰²⁾

Digesto pancreático de caseína		5,0 g
Digesto péptico de tecido animal		5,0 g
Dextrose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)		20,0 g
Água	qsp	1000 mL
pH após esterilização: 5,7 ± 0,1		

4.3.4. MEIO DE CLAUSEN (ditionato-tioglicolato) ⁽³⁷⁾

L-Cistina	0,5 g
L-Asparagina	1,25 g
Cloreto de sódio	2,5 g
Citrato de sódio	1,0 g
Fosfato de potássio dibásico	2,0 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,4 g
Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	0,004 g
Sulfato de cobalto ($\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,001 g
Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)	0,001 g
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,001 g
Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,001 g
Cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	0,0002 g
Dextrose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	6,0 g
Triptona	15,0 g
Lecitina	0,3 g
Ágar granulado (umidade não maior que 15%)	0,75 g
Extrato de levedura (solúvel em água)	6,0 g
Digesto pancreático de caseína	3,0 g
Tioglicolato de sódio	0,5 g
Ditionato de sódio	0,4 g
Solução de resazurina sódica	0,001 g
Polietileno sorbitol mono-oleato	3,0 g
Glicerol	5,0 g
Água	qsp 1000 mL

pH após esterilização: $7,1 \pm 0,2$

5. MÉTODOS

5.1. QUALIFICAÇÃO DAS INSTALAÇÕES

Todas as instalações envolvidas nos testes de esterilidade foram qualificadas de acordo com cronograma e protocolo desenvolvidos pelo grupo designado do Instituto Adolfo Lutz.

Os testes foram executados em unidade de fluxo laminar vertical (modelo VLFS-18 / nº de série FL3752 – VECO), que satisfaz aos requisitos de Classe 100, por sua vez alocada em uma sala biolimpa.

A sala biolimpa é provida de sistema de alimentação de ar forçado, filtrado através de filtros de alta eficiência (HEPA), sendo a distribuição do ar feita em regime de fluxo não unidirecional (turbulento), onde as partículas são espalhadas no ambiente e diluídas no volume de ar circulante, mantendo a concentração abaixo dos níveis permitidos pelas normas, satisfazendo aos requisitos de Classe 10.000. Tal sala apresenta pressão positiva em relação às salas adjacentes, além de controles de temperatura e umidade relativa.

Para o monitoramento microbiológico do ar, realizado durante todos os testes, foi utilizado o método semi-quantitativo ou monitoramento passivo, com utilização de placas de sedimentação, contendo Agar Caseína de Soja (25 mL por placa). As placas foram expostas em diversos pontos da sala biolimpa e da unidade de fluxo laminar, durante as operações, pelo período máximo de 1 hora, na altura de trabalho. A incubação das placas expostas foi feita em estufa a 20-25 °C, por 5 dias e, em seguida a 30-35 °C, por mais 2 dias.

Para o monitoramento microbiológico das superfícies, foram utilizadas placas de contato, conhecidas como placas Rodac[®], contendo Agar Caseína

de Soja e polissorbato 80 (0,5%). Assim como as placas de sedimentação, estas foram incubadas em estufa a 20-25 °C, por 5 dias e, em seguida a 30-35 °C, por mais 2 dias.

5.2. QUALIFICAÇÃO DO OPERADOR

Durante a execução dos testes, todos os elementos que auxiliaram na execução dos testes foram treinados na execução dos procedimentos para trabalho em salas limpas, assim como nas técnicas dos testes.

Com relação à vestimenta utilizada, esta foi confeccionada em tecido sintético, de fios contínuos e entrelaçados. A paramentação foi composta de touca, máscara, macacão, sapatilhas e luvas.

Para o monitoramento microbiológico do operador, foram utilizadas placas de contato, conhecidas como placas Rodac[®], contendo Agar Caseína de Soja e polissorbato 80 (0,5%). Neste monitoramento, foram monitorados as mãos, antebraços e peito do operador. A incubação foi feita em estufa a 20-25 °C, por 5 dias e, em seguida a 30-35 °C, por mais 2 dias.

5.3. VALIDAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE

5.3.1. CONTROLES NEGATIVOS

Todo material envolvido no teste, meios de cultura, solução de lavagem, dispositivos para transferência de amostra, frascos de solução fisiológica, tesouras e pinças, etc., foram testados quanto sua esterilidade, evitando a ocorrência de resultados falso-positivos.

5.3.2. CONTROLES POSITIVOS

Os controles positivos foram obtidos pela inoculação de volume adequado da suspensão do microrganismo específico para obter níveis de 5 UFC e 10 UFC em cada tubo de meio de cultura utilizado.

Após a inoculação do microrganismo, a cada tubo de meio de cultura foram transferidas alíquotas de 2,0 ml da amostra, que representou a condição de pior caso em termos de proporção amostra:meio de cultura, inerente ao método empregando inoculação direta.

Todos os meios de cultura inoculados foram incubados sob cada condição de temperatura do estudo (12, 22, 32 e 42 °C), por um período de 7 dias, sendo considerados satisfatórios desde que apresentassem evidência de crescimento.

Este procedimento de controle foi executado em triplicata, para cada tipo de meio de cultura inoculado com cada um dos tipos de microrganismos, respeitando as condições indicadas de temperatura de incubação.

5.3.2.1. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO MICROBIANA

Os microrganismos foram cultivados em:

- ❖ ágar caseína de soja inclinado, incubado a 30-35 °C, por 24 a 48 horas, no caso de bactérias; e
- ❖ ágar Sabouraud contendo cloranfenicol (50 mg/L) inclinado, incubado a 20-25 °C, por 7 dias, no caso de fungos.

Os repiques foram feitos por estrias sobre a superfície do ágar inclinado contido em tubos de ensaio de (25 x 150) mm previamente esterilizados, de modo a se obter uma película uniforme de crescimento, e então incubados sob as condições de tempo e temperatura acima descritos.

A massa microbiana resultante foi coletada da superfície do ágar com o recurso de adição de 10 mL de solução peptonada a 0,1% contendo polissorbato 80 (0,5%) estéril e a seguir, transferida para tubo de ensaio de (25 x 150) mm também estéril.

A densidade da suspensão foi estimada por método de plaqueamento em profundidade, ou método "Pour Plate". A suspensão microbiana foi homogeneizada em agitador de tubos do tipo vórtex (MARCONI – Modelo MA-162), por 3 minutos. Foram preparadas diluições decimais seriadas, de diluição 1:10 até 1:10⁸, em tubos de ensaio estéreis de (25 x 150) mm, utilizando solução peptonada a 0,1% estéril como diluente. Todas as diluições foram homogeneizadas durante 1 minuto, em agitador de tubos. De cada diluição, foram transferidas alíquotas de 1,0 mL para o centro de duas placas de Petri estéreis, com o auxílio de pipetas de vidro estéreis. Foram adicionados de 15 a 20 mL de ágar caseína de soja, para a contagem de bactérias ou 15 a 20 mL de ágar Sabouraud contendo cloranfenicol (50 mg/L), para a contagem de fungos. Os meios de cultura esterilizados, foram previamente ao uso, fundidos e resfriados a 45 °C. Cada placa foi homogeneizada por movimentos rotatórios e mantidas até solidificar. Foram então invertidas e incubadas a temperatura ótima de crescimento durante 24 a 48 horas, no caso de bactérias e por 7 dias, no caso de fungos. Após o período de incubação, as placas foram submetidas a contagem, utilizando contador de colônias (BIOMATIC Aparelhos Científicos Ltda.).

Depois de estimada a densidade da suspensão microbiana, o inóculo foi ajustado, por diluição em solução peptonada a 0,1% estéril, até obtenção de suspensões contendo 10 UFC/mL e 100 UFC/mL. Estas suspensões

foram mantidas em geladeira, sendo utilizadas dentro de um período de 7 dias.

Sempre que utilizadas, a densidade microbiana das suspensões ajustadas foi confirmada pelo método “Pour Plate” .

5.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS INTENCIONALMENTE CONTAMINADAS

As unidades comercialmente obtidas de amostra foram imersas por 15 minutos em solução de álcool 70% (v/v), para limpar e desinfetar a superfície externa dos frascos e então secas com gaze estéril.

Foram separadas em grupos contendo quarenta unidades e cada grupo foi dividido em subgrupos contendo dez unidades, identificadas por números de 1 a 10. De cada subgrupo, foi retirada uma unidade, aleatoriamente, que foi contaminada com determinado tipo de microrganismo em determinada carga de contaminação. Utilizou-se para a contaminação intencional as mesmas suspensões preparadas para a etapa de execução dos controles positivos (item 5.3.2.1), devidamente diluídas e padronizadas.

A contaminação foi feita através da transferência, por meio de seringas e agulhas hipodérmicas, de volume adequado do inóculo ajustado para obter níveis de contaminação do estudo (FIGURA 2). Para obtenção de nível de contaminação de 50 UFC por unidade de amostra, transferiu-se 0,5 mL da suspensão contendo 100 UFC/mL; para obtenção de níveis de contaminação de 10 e 5 UFC por unidade de amostra, transferiu-se 1,0 e 0,5 mL, respectivamente, da suspensão contendo 10 UFC/mL.

FIGURA 2 – Ilustração dos recursos empregados na contaminação intencional da amostra

Após a contaminação, os frascos foram envolvidos em “parafilm” e mantidos em geladeira até o momento do teste, que ocorreu no máximo 24 horas depois.

Para cada método de teste de esterilidade empregado, foi utilizado um grupo de amostras contaminadas com determinado tipo de microrganismo em determinada carga de contaminação. Ainda que sabidamente não estéreis, todas as amostras sofreram assepsia externa, com solução de álcool 70% (v/v), antes de serem introduzidas na sala biolimpa para o teste de esterilidade.

5.5. TESTE DE ESTERILIDADE

5.5.1. MÉTODOS

Foram realizados, com as amostras intencionalmente contaminadas, 3024 testes de esterilidade utilizando-se três métodos de inoculação, cujas técnicas encontram-se detalhadas nos itens específicos:

- ❖ Método empregando inoculação direta, ou método direto (1296 testes)
- ❖ Método empregando inoculação indireta nos moldes convencionais, ou método indireto convencional (864 testes)
- ❖ Método empregando inoculação indireta em sistema fechado (Steritest[®]), ou método indireto fechado (864 testes)

5.5.2. PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

5.5.2.1. MÉTODO DIRETO

Para cada grupo de material de estudo, foram separados quarenta tubos de ensaio de (25 x 150) mm contendo 20 mL de cada tipo de meio de cultura. Estes tubos eram identificados pelo tipo, da seguinte forma:

- ❖ T, para Meio de Tioglicolato;
- ❖ C, para Meio de caseína de soja;
- ❖ S, para Meio de Sabouraud; e
- ❖ CL, para Meio de Clausen.

Os meios de cultura foram separados em estantes, de maneira que cada uma contivesse dez tubos de cada tipo de meio de cultura.

5.5.2.2. MÉTODO INDIRETO CONVENCIONAL

Para cada grupo de material de estudo, foram separados quatro tubos de ensaio de (38 x 250) mm contendo 100 mL de cada tipo de meio de cultura. Estes tubos eram identificados pelo tipo, da seguinte forma:

- ❖ T, para Meio de Tioglicolato;
- ❖ C, para Meio de caseína de soja;
- ❖ S, para Meio de Sabouraud;
- ❖ CL, para Meio de Clausen.

Os meios de cultura foram separados em estantes, de maneira que cada uma contivesse um tubo de cada tipo de meio de cultura.

5.5.2.3. MÉTODO INDIRETO FECHADO

Para cada grupo de material de estudo, foram separados quatro frascos de vidro contendo 100 mL de cada tipo de meio de cultura. Estes frascos eram identificados pelo tipo, da seguinte forma:

- ❖ T, para Meio de Tioglicolato;
- ❖ C, para Meio de caseína de soja;
- ❖ S, para Meio de Sabouraud;
- ❖ CL, para Meio de Clausen.

Os meios de cultura foram separados em estantes, de maneira que cada uma contivesse um frasco de cada tipo de meio de cultura.

5.5.3. TÉCNICA

5.5.3.1. MÉTODO DIRETO

De cada unidade de um subgrupo de material de estudo, foram transferidas alíquotas de 2,0 mL, por meio de seringas e agulhas estéreis, para um tubo de ensaio de (25x150) mm contendo 20 mL de cada tipo de meio de cultura. O líquido foi misturado com o meio de cultura, sem arejar excessivamente.

O procedimento foi repetido até que os 40 tubos de cada tipo de meio de cultura fossem inoculados.

Uma série de 10 tubos de cada tipo de meio de cultura foi incubada, por período de 28 dias, sob cada uma das determinadas condições de temperatura indicadas (12, 22, 32 e 42 °C).

5.5.3.2. MÉTODO INDIRETO CONVENCIONAL

O trabalho operacional é precedido pela preparação dos sistemas de filtração, compostos por um receptáculo e uma base sobre a qual colocou-se a membrana, de éster de celulose, com diâmetro de 47 mm e porosidade nominal de $0,45 \pm 0,02 \mu\text{m}$ (FIGURAS 3 e 4). Os sistemas de filtração foram montados e esterilizados em autoclave a 121°C, por 30 minutos.

FIGURA 3 – Membrana filtrante utilizada no teste de esterilidade empregando inoculação indireta nos moldes convencionais

FIGURA 4 – Sistema de filtração convencional

Dois sistemas de filtração esterilizados, submetidos a assepsia externa da embalagem e introduzidos na sala biolimpa, foram adaptados a suporte de aço inoxidável (manifold) e este a um frasco coletor (kitassato), conectado à bomba de vácuo.

Na execução da técnica, no ambiente adequado e contando com sistemas de filtração já preparados e estéreis, de cada unidade de um subgrupo de material de estudo, foram transferidas alíquotas de 4,0 mL, por meio de seringas e agulhas estéreis, para dois frascos estéreis.

Após a transferência do volume de cada uma das unidades do subgrupo, o conteúdo de cada frasco foi vertido para cada um dos sistemas de filtração.

O líquido foi filtrado, com fluxo de 55 a 75 mL de água/cm²/minuto, à pressão de 70 cmHg. Após a passagem da amostra, cada uma das membranas foi lavada com três porções de 100 mL de solução peptonada a 0,1% estéril.

Terminada a filtração, o sistema é desligado, o copo retirado da base e, com auxílio de pinça e tesoura estéreis, cada uma das membranas foi seccionada em duas partes iguais e cada metade transferida para um tubo contendo determinado tipo de meio de cultura.

O procedimento foi repetido até que os 4 tubos de cada tipo de meio de cultura fossem inoculados.

Um tubo de cada tipo de meio de cultura foi incubado, por período de 28 dias, sob cada uma das condições de temperatura indicadas (12,22,32 e 42 °C).

5.5.3.3.MÉTODO INDIRETO FECHADO

Os sistemas de filtração para uso no Steritest[®] são fornecidos pela MILLIPORE, embalados individualmente e pré-esterilizados. São compostos por tubos estéreis ligados a duas câmaras de filtração, denominadas

“canister”, onde se encontram as membranas filtrantes, de ésteres de celulose com diâmetro de 47 mm e porosidade nominal de $0,45 \pm 0,02 \mu\text{m}$ (FIGURA 5).

FIGURA 5 – Sistema de filtração para teste de esterilidade empregando inoculação indireta em sistema fechado.

O sistema de filtração, depois de introduzido na sala biolimpa, foi disposto no equipamento Steritest[®], sendo as câmaras de filtração colocadas sobre base de aço inoxidável e os tubos dispostos na bomba peristáltica (FIGURA 6). O equipamento foi adaptado a frasco coletor (kitassato) e ajustado o fluxo de operação para 55 mL de água/cm²/minuto.

FIGURA 6 – Equipamento para teste de esterilidade em sistema fechado (Steritest®)

De cada unidade de um subgrupo de material de estudo, foram transferidas alíquotas de 4,0 mL, por meio de seringas e agulhas estéreis, para dois frascos estéreis.

Após a transferência do volume de cada uma das unidades do subgrupo, o conteúdo de cada frasco foi transferido para o interior das câmaras de filtração através dos tubos estéreis, sendo a amostra dividida automaticamente entre as câmaras de filtração.

Após a passagem da amostra, cada uma das membranas foi lavada com três porções de 100 mL de solução peptonada a 0,1% estéril.

Terminada a filtração, o sistema é desligado, a parte inferior de cada câmara de filtração é selada e o tubo ligado a uma das câmaras é bloqueado. O sistema é ligado novamente e um tipo de meio de cultura é transferido para o interior da câmara de filtração.

O sistema é desligado e o tubo ligado à câmara já preenchida é então bloqueado, liberando-se a outra câmara de filtração. O sistema é novamente ligado e a câmara de filtração preenchida com outro tipo de meio de cultura. Ao término do processo, o sistema é desligado e o tubo desta câmara é então bloqueado. Os tubos são cortados acima dos grampos de bloqueio.

O procedimento foi repetido com o outro frasco estéril, utilizando os outros dois tipos de meio de cultura.

Todo o procedimento é repetido até obtenção de 4 câmaras de filtração preenchidas com cada tipo de meio de cultura.

Uma câmara de filtração contendo cada tipo de meio de cultura foi incubada, por período de 28 dias, sob determinada condição de temperatura (12, 22, 32 e 42 °C).

5.6. CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO E LEITURA DOS RESULTADOS

Todos os testes foram incubados, por período de 28 dias, nas seguintes temperaturas:

❖ 12 °C

❖ 22 °C

❖ 32 °C

❖ 42 °C

A observação dos tubos foi feita diariamente, sendo marcado o dia em que foram observados os eventuais crescimentos. Todo crescimento que

tenha sido observado durante o período de incubação foi submetido à coloração de Gram e a testes bioquímicos, a fim de confirmar o tipo de microrganismo.

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Aplicou-se análise de variância (SAS Institute, Inc. SAS/STAT Users Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989. 846 pp) para análise dos resultados obtidos nos distintos tipos de testes efetuados, considerando-se os diferentes microrganismos, suas concentrações, meios de cultura e condições de incubação adotadas.

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos das contagens das suspensões microbianas empregadas na elaboração dos controles positivos assim como na inoculação intencional das amostras são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – Resultados obtidos das contagens das suspensões microbianas empregadas

MICROORGANISMO		NÚMERO DE CÉLULAS/mL
<i>Aspergillus niger</i>	(ATCC 16404)	$1,5 \times 10^5$
<i>Bacillus subtilis</i>	(ATCC 6633)	$2,1 \times 10^{10}$
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)	$8,1 \times 10^7$
<i>Clostridium sporogenes</i>	(ATCC 11437)	$2,3 \times 10^8$
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 10536)	$4,2 \times 10^9$
<i>Micrococcus luteus</i>	(ATCC 9341)	$1,1 \times 10^9$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 9027)	$1,4 \times 10^8$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(ATCC 9736)	$1,1 \times 10^7$
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 6538)	$1,6 \times 10^9$

Os resultados de leitura obtidos para os testes de esterilidade adotando comparativamente métodos direto, indireto convencional e indireto em sistema fechado são apresentados para cada um dos microrganismos utilizados nos inóculos intencionais, nos diferentes níveis de contaminação:

- ❖ Tabelas 2, 3 e 4 para *Aspergillus niger* (ATCC 16404), respectivamente a 5, 10 e 50 UFC/unidade;
- ❖ Tabelas 5, 6 e 7 para *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), respectivamente a 5, 10 e 50 UFC/unidade;

- ❖ Tabelas 8, 9 e 10 para *Candida albicans* (ATCC 10231), respectivamente a 5, 10 e 50 UFC/unidade;
- ❖ Tabelas 11, 12 e 13 para *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), respectivamente a 5, 10 e 50 UFC/unidade;
- ❖ Tabelas 14, 15 e 16 para *Escherichia coli* (ATCC 10536), respectivamente a 5, 10 e 50 UFC/unidade;
- ❖ Tabelas 17, 18 e 19 para *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), respectivamente a 5, 10 e 50 UFC/unidade;
- ❖ Tabelas 20, 21 e 22 para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), respectivamente a 5, 10 e 50 UFC/unidade;
- ❖ Tabelas 23, 24 e 25 para *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9736), respectivamente a 5, 10 e 50 UFC/unidade;
- ❖ Tabelas 26, 27 e 28 para *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), respectivamente a 5, 10 e 50 UFC/unidade;

TABELA 2 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Aspergillus niger* (ATCC 16404), com nível de contaminação de 5 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	- + ⁹ -	+ ⁽³⁾	- - -	-	- - -	-
Direto	Clausen	- - -	-	+ ³ - + ³	+ ⁽²⁾	- - -	-	- - -	-
Direto	Sabouraud	- - -	-	+ ³ + ³ -	+ ⁽²⁾	- - -	-	+ ⁶ - -	+ ⁽²⁾
Direto	Tioglicolato	- - -	-	+ ³ - + ³	+ ⁽²⁾	- - -	-	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ²² -	+ ⁽¹¹⁾	+ ⁴ + ⁴	+ ⁽⁴⁾	- + ⁴	+ ⁽²⁾	+ ¹ -	+ ^(0,5)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	- -	-	+ ⁴ -	+ ⁽²⁾	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	+ ² + ⁴	+ ⁽³⁾	- + ¹	+ ^(0,5)	- + ¹	+ ^(0,5)
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	+ ² + ⁴	+ ⁽³⁾	+ ² + ⁴	+ ⁽³⁾	+ ² + ¹	+ ^(1,5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	+ ³ + ⁴	+ ^(3,5)	+ ² + ¹	+ ^(1,5)	- + ¹	+ ^(0,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	+ ¹⁹ + ⁵	+ ⁽¹²⁾	- -	-	- + ⁴	+ ⁽²⁾
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	+ ³ + ⁴	+ ^(3,5)	- + ⁴	+ ⁽²⁾	+ ² -	+ ⁽¹⁾
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	- -	-	+ ⁵ + ⁴	+ ^(4,5)	+ ⁴ -	+ ⁽²⁾

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 3 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Aspergillus niger* (ATCC 16404), com nível de contaminação de 10 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	+ ⁹ - -	+(3)	- - -	-	- - -	-
Direto	Clausen	- - -	-	- + ⁶ -	+(2)	- - + ⁶	+(2)	- - -	-
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - -	-	- - -	-	- - + ⁶	+(2)
Direto	Tioglicolato	- - -	-	- - -	-	- - -	-	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	- -	-	+ ³ + ⁴	+(3,5)	- + ¹	+(0,5)	+ ¹ + ¹	+(1)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	- + ⁴	+(2)	- + ¹	+(0,5)	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	+ ³ + ⁴	+(3,5)	+ ² + ¹	+(1,5)	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	+ ² + ⁴	+(3)	+ ² + ¹	+(1,5)	+ ² + ¹	+(1,5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	+ ³ + ⁴	+(3,5)	+ ² + ¹	+(1,5)	+ ³ + ¹	+(2)
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	- + ⁴	+(2)	- -	-	- + ⁴	+(2)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	+ ³ + ⁴	+(3,5)	+ ⁴ + ²	+(3)	+ ² -	+(1)
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	+ ³ + ⁴	+(3,5)	- + ⁴	+(2)	+ ⁴ + ⁴	+(4)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 4 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Aspergillus niger* (ATCC 16404), com nível de contaminação de 50 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	- + ⁶ + ²	+ ^(2,66667)	+ ² + ⁶ + ²	+ ^(3,33333)	+ ⁶ - -	+ ⁽²⁾
Direto	Clausen	- - -	-	+ ⁶ + ³ + ⁶	+ ⁽⁵⁾	+ ² + ² + ⁶	+ ^(3,33333)	- - -	-
Direto	Sabouraud	- - -	-	+ ³ - + ³	+ ⁽²⁾	+ ² + ² + ²	+ ⁽²⁾	- + ⁶ + ⁶	+ ⁽⁴⁾
Direto	Tioglicolato	- - -	-	+ ³ + ⁶ -	+ ⁽³⁾	+ ² + ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ⁶ + ³ -	+ ⁽³⁾
Indireto convencional	Caseína de soja	- + ²⁵	+ ^(12,5)	+ ³ + ³	+ ⁽³⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾	- + ³	+ ^(1,5)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	+ ³ -	+ ^(1,5)	+ ⁴ + ³	+ ^(3,5)	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	+ ²⁰ + ²²	+ ⁽²¹⁾	+ ⁴ + ³	+ ^(3,5)	+ ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ² -	+ ⁽¹⁾
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ²² -	+ ⁽¹¹⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ²⁵ + ²⁵	+ ⁽²⁵⁾	+ ² + ³	+ ^(2,5)	+ ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	- -	-	+ ⁵ + ³	+ ⁽⁴⁾	+ ⁶ -	+ ⁽³⁾
Indireto sist. fechado	Sabouraud	+ ²⁸ + ²⁴	+ ⁽²⁶⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ²⁵ -	+ ^(12,5)	+ ³ + ³	+ ⁽³⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ² -	+ ⁽¹⁾

-

Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação

+^a

Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação

+^(b)

Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 5 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), com nível de contaminação de 5 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ¹⁰ + ⁷ -	+(5,66667)	- + ² + ²	+(1,33333)	+ ¹ + ¹ + ¹	+(1)	+ ¹ + ¹ + ¹	+(1)
Direto	Clausen	+ ¹⁰ - + ⁷	+(5,66667)	- + ⁶ -	+(2)	+ ¹ + ¹ -	+(0,66667)	+ ¹ - -	+(0,33333)
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - -	-	- - + ⁴	+(1,33333)	- - -	-
Direto	Tioglicolato	- - -	-	+ ⁶ - + ²	+(2,66667)	- - -	-	- - + ²	+(0,66667)
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ⁷ -	+(3,5)	+ ² + ²	+(2)	- -	-	+ ¹ + ¹	+(1)
Indireto convencional	Clausen	- + ⁸	+(4)	- + ²	+(1)	- + ⁴	+(2)	- + ¹	+(0,5)
Indireto convencional	Sabouraud	- + ⁹	+(4,5)	- -	-	+ ¹⁶ + ²	+(9)	- + ²	+(1)
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ⁷ + ⁸	+(7,5)	- -	-	- + ²	+(1)	+ ¹ + ⁹	+(5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ¹⁰ + ¹⁴	+(12)	+ ⁵ + ⁴	+(4,5)	+ ¹ + ²⁵	+(13)	- + ¹	+(0,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	+ ⁴ + ⁴	+(4)	- + ⁴	+(2)	+ ¹ -	+(0,5)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- + ²¹	+(10,5)	- -	-	+ ¹⁹ -	+(9,5)
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	- -	-	+ ² + ⁴	+(3)	- + ⁷	+(3,5)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 6 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), com nível de contaminação de 10 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ¹⁰ + ¹⁴ -	+ ⁽⁸⁾	+ ⁶ + ⁶ + ²	+ ^(4,66667)	+ ¹ + ¹ + ¹	+ ⁽¹⁾	+ ¹ + ¹ + ¹	+ ⁽¹⁾
Direto	Clausen	+ ¹⁰ + ¹⁰ -	+ ^(6,66667)	+ ⁶ + ⁶ + ²	+ ^(4,66667)	- - -	-	+ ¹ + ¹ -	+ ^(0,66667)
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - -	-	- - -	-	- - -	-
Direto	Tioglicolato	+ ¹⁷ + ¹⁷ + ⁷	+ ^(13,6667)	- - + ²	+ ^(0,66667)	- - + ¹	+ ^(0,33333)	+ ⁶ - -	+ ⁽²⁾
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ⁶ + ⁷	+ ^(6,5)	+ ³ + ⁴	+ ^(3,5)	+ ¹ + ⁴	+ ^(2,5)	+ ¹ + ¹	+ ⁽¹⁾
Indireto convencional	Clausen	- + ³	+ ^(1,5)	+ ⁴ + ³	+ ^(3,5)	- + ¹	+ ^(0,5)	+ ¹ -	+ ^(0,5)
Indireto convencional	Sabouraud	+ ²¹ -	+ ^(10,5)	+ ⁶ + ³	+ ^(4,5)	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- + ⁷	+ ^(3,5)	- + ³	+ ^(1,5)	+ ⁴ + ³	+ ^(3,5)	+ ¹ + ¹	+ ⁽¹⁾
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- + ¹¹	+ ^(5,5)	+ ⁵ + ³	+ ⁽⁴⁾	+ ³ + ³	+ ⁽³⁾	- + ³	+ ^(1,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	- + ⁶	+ ⁽³⁾	- -	-	+ ³ -	+ ^(1,5)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	+ ¹⁹ -	+ ^(9,5)	+ ²⁷ -	+ ^(13,5)	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ¹⁴ + ¹¹	+ ^(12,5)	+ ⁵ + ⁴	+ ^(4,5)	+ ² + ⁵	+ ^(3,5)	+ ⁵ -	+ ^(2,5)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 7 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), com nível de contaminação de 50 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ⁹ + ¹⁰ + ⁷	+(8,66667)	+ ⁶ + ⁶ + ¹	+(4,33333)	+ ¹ + ¹ + ¹	+(1)	+ ¹ + ¹ + ¹	+(1)
Direto	Clausen	+ ¹⁰ + ¹⁰ + ⁷	+(9)	+ ⁶ + ⁷ + ¹	+(4,66667)	+ ¹ + ¹ + ¹	+(1)	+ ¹ + ¹ + ²	+(1,33333)
Direto	Sabouraud	- - -	-	- + ²⁰ + ¹⁹	+(13)	- - + ¹²	+(4)	- - -	-
Direto	Tioglicolato	+ ⁹ + ¹⁰ + ⁷	+(8,66667)	+ ⁶ + ⁷ + ¹	+(4,66667)	+ ¹ + ¹ + ²	+(1,33333)	+ ¹ + ¹ + ²	+(1,33333)
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ⁶ + ⁶	+(6)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ¹ + ¹	+(1)	+ ¹ + ¹	+(1)
Indireto convencional	Clausen	+ ⁶ + ⁹	+(7,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ¹ + ¹	+(1)	+ ¹ + ²	+(1,5)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	+ ⁹ + ⁷	+(8)	+ ¹ + ²	+(1,5)	- + ²	+(1)
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ⁶ + ⁸	+(7)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ¹ + ¹	+(1)	+ ¹ + ²	+(1,5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ⁷ + ⁸	+(7,5)	+ ² + ³	+(2,5)	+ ¹ + ²	+(1,5)	+ ¹ + ²	+(1,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	+ ⁸ + ¹⁰	+(9)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ² + ²	+(2)	+ ² + ²	+(2)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	+ ¹¹ + ¹²	+(11,5)	+ ³ + ⁴	+(3,5)	+ ² + ²	+(2)	+ ² + ²	+(2)
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ¹³ + ¹⁰	+(11,5)	+ ³ + ³	+(3)	+ ² + ²	+(2)	+ ² + ²	+(2)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 8 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Candida albicans* (ATCC 10231), com nível de contaminação de 5 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ¹³ + ¹² + ¹⁰	+(11,66667)	- + ¹ -	+(0,33333)	+ ¹³ - -	+(4,33333)	+ ⁸ - -	+(2,66667)
Direto	Clausen	- - + ¹⁰	+(3,33333)	+ ⁶ + ¹ + ⁴	+(3,66667)	- + ² + ⁶	+(2,66667)	- - -	-
Direto	Sabouraud	- - -	-	+ ⁶ - -	+(2)	- - -	-	- - + ³	+ ¹
Direto	Tioglicolato	- + ¹¹ + ¹⁰	+(7)	- + ¹ -	+(0,33333)	- - -	-	- - + ³	+(1)
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ¹³ -	+(6,5)	+ ²⁴ -	+(12)	+ ¹⁴ + ¹³	+(13,5)	- -	-
Indireto convencional	Clausen	- -	-	- -	-	+ ¹⁰ + ⁵	+(7,5)	- + ³	+(1,5)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	+ ³ + ³	+(3)	+ ³ -	+(1,5)	- + ⁵	+(2,5)
Indireto convencional	Tioglicolato	- + ¹³	+(6,5)	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- + ¹¹	+(5,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	- -	-
Indireto sist. fechado	Clausen	- + ¹²	+(6)	- -	-	+ ⁵ -	+(2,5)	- + ⁵	+(2,5)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- + ¹²	+(6)	- + ⁴	+(2)	- + ⁴	+(2)	+ ⁴ -	+(2)
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 9 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Candida albicans* (ATCC 10231), com nível de contaminação de 10 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ¹⁰ + ¹³ -	+(7,66667)	+ ² + ² + ²	+(2)	+ ² + ² -	+(1,33333)	+ ³ - + ³	+(2)
Direto	Clausen	+ ²⁰ + ¹⁴ -	+(11,3333)	+ ³ + ² + ²	+(2,33333)	+ ² + ² -	+(1,33333)	- - -	-
Direto	Sabouraud	+ ¹⁰ + ¹³ + ¹⁰	+(11)	+ ² + ² + ³	+(2,33333)	+ ² + ² + ³	+(2,33333)	+ ² - -	+(0,66667)
Direto	Tioglicolato	- - + ¹⁰	+(3,33333)	+ ³ + ¹³ -	+(5,33333)	+ ² + ² + ³	+(2,33333)	- + ³ -	+(1)
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ¹³ + ¹³	+(13)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ¹¹ + ³	+(7)	+ ⁴ + ⁴	+(4)
Indireto convencional	Clausen	+ ¹³ -	+(6,5)	- + ⁴	+(2)	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	+ ¹³ + ¹³	+(13)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ + ⁶	+(5)	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ¹¹ + ¹³	+(12)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	- + ⁵	+(2,5)	+ ⁵ -	+(2,5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- + ¹¹	+(5,5)	+ ⁵ + ⁴	+(4,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁵ -	+(2,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	+ ¹⁷ + ¹³	+(15)	+ ⁴ + ⁶	+(5)	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Sabouraud	+ ¹¹ + ¹¹	+(11)	+ ⁴ + ¹¹	+(7,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ + ⁶	+(5)
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ¹⁷ + ¹¹	+(14)	+ ⁵ + ⁴	+(4,5)	+ ⁴ + ⁵	+(4,5)	- + ⁴	+(2)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 10 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Candida albicans* (ATCC 10231), com nível de contaminação de 50 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ¹⁵ + ¹⁰ + ¹¹	+(12)	- + ¹ + ³	+(1,33333)	+ ¹ + ¹ + ³	+(1,66667)	+ ¹ - + ³	+(1,33333)
Direto	Clausen	+ ⁸ + ¹² + ¹⁰	+(10)	+ ¹ + ¹ + ³	+(1,66667)	+ ¹ + ¹ + ³	+(1,66667)	- - -	-
Direto	Sabouraud	+ ⁶ + ¹¹ + ¹⁰	+(9)	+ ¹ + ¹ + ³	+(1,66667)	+ ¹ + ¹ + ³	+(1,66667)	+ ² - + ⁴	+(2)
Direto	Tioglicolato	+ ¹⁵ - + ¹⁰	+(8,33333)	+ ² - + ³	+(1,66667)	- + ¹ + ³	+(1,33333)	+ ² + ² + ³	+(2,33333)
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ⁸ + ¹⁰	+(9)	+ ⁴ + ³	+(3,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ + ³	+(3,5)
Indireto convencional	Clausen	+ ¹¹ + ¹¹	+(11)	- + ³	+(1,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ -	+(2)
Indireto convencional	Sabouraud	+ ⁸ + ¹¹	+(9,5)	+ ⁴ + ³	+(3,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ + ³	+(3,5)
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ¹¹ + ¹¹	+(11)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	- + ⁴	+(2)	+ ⁴ + ⁶	+(5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ¹² + ¹¹	+(11,5)	+ ⁴ + ³	+(3,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ + ³	+(3,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	+ ¹¹ + ¹¹	+(11)	+ ¹¹ + ⁴	+(7,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ + ⁴	+(4)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	+ ¹¹ + ¹¹	+(11)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ + ³	+(3,5)	+ ⁴ + ³	+(3,5)
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ¹¹ + ¹¹	+(11)	+ ⁴ + ³	+(3,5)	+ ⁴ + ⁴	+(4)	+ ⁴ + ⁴	+(4)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 11 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), com nível de contaminação de 5 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	- - + ⁸	+ ^(2,66667)	- - -	-	- - -	-
Direto	Clausen	- - -	-	- - -	-	- + ⁹ -	+ ⁽³⁾	- - -	-
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - -	-	- + ⁴ -	+ ^(1,33333)	- - -	-
Direto	Tioglicolato	- - -	-	- + ² + ⁹	+ ^(3,66667)	- - -	-	- + ² -	+ ^(0,66667)
Indireto convencional	Caseína de soja	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Clausen	- -	-	- + ⁵	+ ^(2,5)	+ ⁵ -	+ ^(2,5)	- + ⁴	+ ⁽²⁾
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	- -	-	- -	-	+ ⁵ + ⁵	+ ⁽⁵⁾
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	- -	-	- + ⁶	+ ⁽³⁾	- + ⁴	+ ⁽²⁾
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	- + ⁶	+ ⁽³⁾	- -	-	- -	-

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 12 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), com nível de contaminação de 10 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	---	-	---	-	---	-	---	-
Direto	Clausen	---	-	- + ⁷ -	+ (2,33333)	+ ⁷ + ⁹ + ⁵	+ (7)	---	-
Direto	Sabouraud	---	-	---	-	- - + ⁵	+ (1,66667)	---	-
Direto	Tioglicolato	---	-	+ ³ - + ⁹	+ (4)	- + ⁷ + ⁵	+ (4)	---	-
Indireto convencional	Caseína de soja	--	-	--	-	--	-	--	-
Indireto convencional	Clausen	--	-	- + ⁵	+ (2,5)	--	-	+ ⁴ + ⁴	+ (4)
Indireto convencional	Sabouraud	--	-	--	-	--	-	--	-
Indireto convencional	Tioglicolato	--	-	+ ⁵ + ⁶	+ (5,5)	- + ⁴	+ (2)	+ ⁴ -	+ (2)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	--	-	--	-	--	-	--	-
Indireto sist. fechado	Clausen	--	-	+ ⁴ + ⁴	+ (4)	--	-	- + ⁴	+ (2)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	--	-	--	-	--	-	--	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	--	-	- + ⁴	+ (2)	+ ⁴ + ⁵	+ (4,5)	+ ⁴ + ⁴	+ (4)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 13 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), com nível de contaminação de 50 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	- - -	-	- - -	-	- - -	-
Direto	Clausen	- - + ⁶	+(2)	+ ² - + ⁵	+(2,33333)	+ ² - + ⁵	+(2,33333)	+ ² + ⁴ -	+(2)
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - -	-	- - -	-	- - -	-
Direto	Tioglicolato	- - -	-	- + ³ -	+(1)	+ ² + ² -	+(1,33333)	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Clausen	- -	-	+ ⁵ -	+(2,5)	+ ⁶ + ⁶	+(6)	+ ⁴ + ⁴	+(4)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	+ ⁴ + ⁵	+(4,5)	- + ⁵	+(2,5)	+ ⁴ -	+(2)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	+ ⁸ -	+(4)	+ ⁵ + ⁶	+(5,5)	- + ⁴	+(2)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	+ ⁵ + ⁶	+(5,5)	+ ⁵ + ⁶	+(5,5)	+ ⁵ -	+(2,5)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 14 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 10536), com nível de contaminação de 5 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	+ ¹ - + ⁶	+(2,33333)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)	- - -	-
Direto	Clausen	- - -	-	+ ¹ + ³ + ³	+(2,33333)	- + ³ + ¹	+(1,33333)	+ ¹ + ³ -	+(1,33333)
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - + ³	+(1)	- - -	-	- - -	-
Direto	Tioglicolato	- - -	-	+ ¹ + ³ + ³	+(2,33333)	+ ¹ - + ³	+(1,33333)	+ ¹ - + ¹	+(0,666667)
Indireto convencional	Caseína de soja	- -	-	+ ³ + ¹⁰	+(6,5)	+ ² + ³	+(2,5)	+ ³ + ¹	+(2)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	- + ¹³	+(6,5)	- + ²	+(1)	+ ³ -	+(1,5)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- + ⁶	+(3)	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	+ ³ + ²	+(2,5)	+ ² + ³	+(2,5)	+ ³ + ¹	+(2)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	+ ⁵ + ⁶	+(5,5)	+ ² + ²	+(2)	- + ¹	+(0,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	- + ⁷	+(3,5)	+ ² + ²	+(2)	- -	-
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- -	-	+ ² -	+(1)	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	+ ⁶ -	+(3)	- + ¹	+(0,5)	+ ² -	+(1)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 15 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 10536), com nível de contaminação de 10 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	+ ¹ + ⁶ + ³	+(3,33333)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)
Direto	Clausen	- - -	-	+ ¹ + ³ -	+(1,33333)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)	- + ³ -	+(1)
Direto	Sabouraud	+ ¹³ - -	+(4,33333)	- + ³ + ³	+(2)	- - -	-	- - -	-
Direto	Tioglicolato	- - -	-	+ ¹ + ³ + ³	+(2,33333)	+ ¹ + ³ + ³	+(2,33333)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)
Indireto convencional	Caseína de soja	- -	-	+ ² + ³	+(2,5)	+ ³ + ¹	+(2)	+ ³ + ¹	+(2)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	+ ² + ³	+(2,5)	+ ³ + ¹	+(2)	+ ³ + ¹	+(2)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	+ ⁴ + ⁶	+(5)	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	+ ² + ³	+(2,5)	+ ² + ³	+(2,5)	+ ³ + ¹	+(2)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	+ ⁵ -	+(2,5)	+ ² + ¹	+(1,5)	+ ¹ + ¹	+(1)
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	+ ⁵ + ¹⁰	+(7,5)	+ ⁵ + ²	+(3,5)	+ ² + ¹	+(1,5)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- + ³	+(1,5)	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	+ ⁵ -	+(2,5)	+ ¹ -	+(0,5)	+ ¹ + ¹	+(1)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 16 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Escherichia coli* (ATCC 10536), com nível de contaminação de 50 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	+ ¹ + ⁷ + ³	+(3,666667)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)
Direto	Clausen	+ ¹⁹ - -	+(6,333333)	+ ¹ + ³ + ³	+(2,333333)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)
Direto	Sabouraud	+ ¹⁴ - -	+(4,666667)	- + ³ + ³	+(2)	+ ⁸ + ⁷ -	+(5)	- - -	-
Direto	Tioglicolato	+ ¹⁹ - -	+(6,333333)	+ ¹ + ³ + ³	+(2,333333)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)	+ ¹ + ³ + ¹	+(1,666667)
Indireto convencional	Caseína de soja	- -	-	+ ² + ³	+(2,5)	+ ³ + ²	+(2,5)	+ ³ + ³	+(3)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	+ ³ + ³	+(3)	+ ³ + ³	+(3)	+ ³ + ³	+(3)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	+ ³ + ³	+(3)	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	+ ³ + ³	+(3)	+ ³ + ²	+(2,5)	+ ³ + ²	+(2,5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	+ ² + ³	+(2,5)	+ ¹ + ²	+(1,5)	+ ¹ + ³	+(2)
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	+ ² + ²	+(2)	+ ³ + ²	+(2,5)	+ ¹ + ³	+(2)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	+ ² + ²	+(2)	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	+ ² + ²	+(2)	+ ² + ²	+(2)	+ ¹ + ²	+(1,5)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 17 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), com nível de contaminação de 5 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	- - + ⁷	+ ^(2,33333)	+ ¹⁰ + ⁵ + ⁵	+ ^(6,666667)	- - -	-
Direto	Clausen	- - -	-	- + ¹⁸ -	+ ⁽⁶⁾	- + ⁵ -	+ ^(1,666667)	- + ² + ⁴	+ ⁽²⁾
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - -	-	- - -	-	+ ⁶ - -	+ ⁽²⁾
Direto	Tioglicolato	- - -	-	- - + ⁶	+ ⁽²⁾	+ ⁶ - + ⁶	+ ⁽⁴⁾	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	- -	-	+ ³ + ⁹	+ ⁽⁶⁾	+ ⁵ + ⁷	+ ⁽⁶⁾	- -	-
Indireto convencional	Clausen	- -	-	- -	-	- + ⁵	+ ^(2,5)	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- + ⁷	+ ^(3,5)	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	- -	-	+ ⁶ -	+ ⁽³⁾	- -	-
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	- + ⁷	+ ^(3,5)	+ ² + ⁴	+ ⁽³⁾	- -	-
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- + ¹¹	+ ^(5,5)	+ ⁸ -	+ ⁽⁴⁾	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 18 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), com nível de contaminação de 10 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ²⁷ + ¹⁹ + ¹⁵	+(20,33333)	- + ⁶ -	+(2)	- + ¹ + ⁴	+(1,666667)	- + ⁶ -	+(2)
Direto	Clausen	- - -	-	+ ⁸ + ⁶ -	+(4,666667)	+ ⁶ - + ⁴	+(3,333333)	- - -	-
Direto	Sabouraud	- - -	-	+ ²³ + ²³ + ²⁰	+(22)	- + ¹ -	+(0,333333)	- - + ⁶	+(2)
Direto	Tioglicolato	- - -	-	+ ⁹ + ⁶ + ⁶	+(7)	+ ⁶ + ¹ + ⁴	+(3,666667)	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ²⁷ -	+(13,5)	+ ⁶ + ⁴	+(5)	+ ² + ⁴	+(3)	+ ³ + ⁴	+(3,5)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	+ ²⁰ -	+(10)	+ ⁴ -	+(2)	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- + ¹⁰	+(5)	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	+ ⁹ + ⁶	+(7,5)	+ ² + ⁶	+(4)	- -	-
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	+ ⁶ + ⁵	+(5,5)	+ ⁵ -	+(2,5)	- -	-
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	+ ¹¹ + ¹²	+(11,5)	+ ⁵ -	+(2,5)	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	+ ¹² -	+(6)	+ ¹² + ⁵	+(8,5)	- -	-

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 19 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), com nível de contaminação de 50 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ²⁸ + ¹³ + ⁷	+ ⁽¹⁶⁾	+ ¹¹ + ⁵ + ⁴	+ ^(6,666667)	- + ² + ⁴	+ ⁽²⁾	- - + ⁴	+ ^(1,333333)
Direto	Clausen	+ ²⁸ + ¹⁸ + ⁴	+ ^(16,66667)	+ ¹¹ + ⁵ + ⁴	+ ^(6,666667)	+ ⁷ + ² + ⁴	+ ^(4,333333)	- - -	-
Direto	Sabouraud	- + ¹⁸ + ⁷	+ ^(8,333333)	+ ²⁵ + ²³ + ⁴	+ ^(17,33333)	- - + ⁴	+ ^(1,333333)	+ ⁷ - -	+ ^(2,333333)
Direto	Tioglicolato	- + ¹⁸ + ⁷	+ ^(8,333333)	+ ¹¹ + ⁵ + ⁴	+ ^(6,666667)	+ ⁷ + ² + ⁴	+ ^(4,333333)	- - + ⁸	+ ^(2,666667)
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ²⁰ + ²⁰	+ ⁽²⁰⁾	+ ⁴ + ⁴	+ ⁽⁴⁾	+ ³ + ⁴	+ ^(3,5)	+ ⁶ + ⁶	+ ⁽⁶⁾
Indireto convencional	Clausen	+ ²⁰ + ²⁰	+ ⁽²⁰⁾	+ ⁴ + ⁴	+ ⁽⁴⁾	+ ⁴ + ⁴	+ ⁽⁴⁾	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ²⁰ + ¹⁶	+ ⁽¹⁸⁾	+ ⁴ + ⁵	+ ^(4,5)	+ ⁴ + ²	+ ⁽³⁾	+ ⁴ + ⁶	+ ⁽⁵⁾
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ²⁴ + ¹⁶	+ ⁽²⁰⁾	+ ⁷ + ⁵	+ ⁽⁶⁾	+ ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ⁴ + ⁶	+ ⁽⁵⁾
Indireto sist. fechado	Clausen	- + ¹⁶	+ ⁽⁸⁾	+ ⁷ -	+ ^(3,5)	+ ⁴ + ⁵	+ ^(4,5)	- -	-
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	+ ⁴ + ²	+ ⁽³⁾	+ ⁴ + ²	+ ⁽³⁾	+ ⁷ + ⁶	+ ^(6,5)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 20 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), com nível de contaminação de 5 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ¹⁹ - -	+(6,33333)	+ ³ + ³ + ³	+(3)	+ ² + ² -	+(1,333333)	+ ¹⁹ - + ²	+(7)
Direto	Clausen	- - -	-	+ ³ + ³ -	+(2)	- - -	-	- - -	-
Direto	Sabouraud	- - + ¹⁴	+(4,666667)	+ ¹⁹ - -	+(6,33333)	+ ¹⁹ + ³ -	+(7,333333)	- - -	-
Direto	Tioglicolato	- + ¹⁰ -	+(3,33333)	+ ³ - + ⁵	+(2,666667)	- - + ³	+(1)	- - + ²	+(0,666667)
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ¹³ + ¹³	+(13)	+ ³ + ⁴	+(3,5)	+ ² -	+(1)	- -	-
Indireto convencional	Clausen	+ ¹³ + ¹³	+(13)	+ ³ -	+(1,5)	+ ² -	+(1)	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ¹³ + ¹³	+(13)	+ ³ + ⁴	+(3,5)	+ ² + ³	+(2,5)	- + ³	+(1,5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ¹³ + ¹³	+(13)	+ ³ + ³	+(3)	+ ³ -	+(1,5)	+ ³ + ³	+(3)
Indireto sist. fechado	Clausen	- + ¹⁷	+(8,5)	+ ⁵ -	+(2,5)	- -	-	+ ³ + ³	+(3)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	+ ³ -	+(1,5)
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ¹³ + ¹³	+(13)	+ ⁵ + ⁴	+(4,5)	+ ³ + ³	+(3)	+ ³ + ³	+(3)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 21 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), com nível de contaminação de 10 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ⁷ + ¹³ -	+ (6,666667)	+ ⁴ + ⁴ + ⁴	+ (4)	+ ⁴ + ⁴ -	+ (2,666667)	- - -	-
Direto	Clausen	+ ⁴ - + ¹⁰	+ (4,666667)	+ ⁴ + ⁶ + ³	+ (4,333333)	+ ⁴ + ⁵ -	+ (3)	- - + ⁴	+ (1,333333)
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - -	-	- - -	-	- - -	-
Direto	Tioglicolato	+ ⁴ + ¹³ + ¹⁰	+ (9)	+ ⁴ + ⁵ + ³	+ (4)	+ ⁴ + ⁴ + ⁶	+ (4,666667)	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ¹³ + ¹¹	+ (12)	+ ³ + ⁵	+ (4)	+ ² + ²	+ (2)	+ ¹ -	+ (0,5)
Indireto convencional	Clausen	- + ¹¹	+ (5,5)	+ ³ + ⁵	+ (4)	+ ² -	+ (1)	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- -	-	- + ⁵	+ (2,5)	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	+ ³ + ⁵	+ (4)	+ ² + ²	+ (2)	+ ² + ¹	+ (1,5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ¹³ -	+ (6,5)	+ ³ + ³	+ (3)	+ ³ + ²	+ (2,5)	+ ³ + ²	+ (2,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	+ ¹⁹ + ¹⁷	+ (18)	+ ⁵ + ⁷	+ (6)	+ ³ + ²	+ (2,5)	+ ³ -	+ (1,5)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ¹³ -	+ (6,5)	+ ³ -	+ (1,5)	+ ³ + ²	+ (2,5)	+ ³ -	+ (1,5)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 22 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), com nível de contaminação de 50 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12	22	32	42	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ¹² + ⁷ + ¹³	+(10,66667)	+ ² + ³ + ⁵	+(3,333333)	+ ² + ¹ + ⁴	+(2,333333)	+ ¹ + ¹ -	+(0,666667)
Direto	Clausen	+ ¹² -+ ¹¹	+(7,66667)	+ ² + ³ + ⁴	+(3)	+ ² + ⁴ + ¹	+(2,333333)	+ ¹ + ³ -	+(1,333333)
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - -	-	+ ¹² + ⁷ + ⁴	+(7,666667)	- - -	-
Direto	Tioglicolato	+ ⁶ + ⁷ + ¹¹	+(8)	+ ² + ³ + ⁴	+(3)	+ ² + ² + ⁵	+(3)	+ ¹ + ³ + ⁵	+(3)
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ⁹ + ¹⁰	+(9,5)	+ ⁵ + ³	+(4)	+ ² + ²	+(2)	+ ¹ + ¹	+(1)
Indireto convencional	Clausen	-+ ¹²	+(6)	-+ ⁴	+(2)	+ ⁵ + ³	+(4)	+ ³ + ¹	+(2)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ⁷ + ⁹	+(8)	+ ⁴ + ⁵	+(4,5)	+ ³ + ⁵	+(4)	-+ ²	+(1)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ¹¹ + ⁹	+(10)	+ ³ + ³	+(3)	+ ³ + ³	+(3)	+ ³ + ³	+(3)
Indireto sist. fechado	Clausen	+ ¹⁷ -	+(8,5)	+ ⁴ + ⁵	+(4,5)	+ ³ + ³	+(3)	+ ³ + ²	+(2,5)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	+ ⁴ -	+(2)	+ ³ + ²	+(2,5)	+ ³ -	+(1,5)
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ¹¹ + ¹⁰	+(10,5)	+ ⁴ + ⁵	+(4,5)	+ ³ + ²	+(2,5)	+ ³ + ³	+(3)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 23 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), com nível de contaminação de 5 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- + ¹⁷ -	+ (5,666667)	+ ⁵ - + ⁴	+ (3)	- - -	-	- - -	-
Direto	Clausen	+ ²² - -	+ (7,333333)	- + ⁵ -	+ (1,666667)	- - -	-	- - -	-
Direto	Sabouraud	- + ¹⁷ + ²⁰	+ (2,333333)	+ ² + ² + ²	+ (2)	+ ¹ + ⁵ + ²	+ (2,666667)	+ ¹ + ³ + ⁵	+ (3)
Direto	Tioglicolato	- - -	-	- - -	-	+ ¹ - -	+ (0,333333)	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ¹⁰ -	+ (5)	- -	-	+ ³ -	+ (1,5)	- -	-
Indireto convencional	Clausen	- + ¹⁶	+ (8)	- -	-	+ ²⁴ -	+ (12)	+ ³ + ¹	+ (2)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	+ ³ -	+ (1,5)	- + ²	+ (1)	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ¹² + ²²	+ (17)	- + ³	+ (1,5)	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Clausen	- + ²¹	+ (10,5)	- + ⁴	+ (2)	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Sabouraud	+ ¹⁰ + ⁷	+ (8,5)	+ ² + ²	+ (2)	+ ³ -	+ (1,5)	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ¹² + ¹⁴	+ (13)	- -	-	- -	-	- -	-

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 24 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), com nível de contaminação de 10 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- + ²¹ -	+ ⁽⁷⁾	+ ⁴ - + ⁴	+ ^(2,666667)	- - -	-	- - -	-
Direto	Clausen	- - -	-	- - -	-	+ ² - -	+ ^(0,666667)	- - -	-
Direto	Sabouraud	- + ²⁰ + ¹⁸	+ ^(12,666667)	+ ² + ² + ²	+ ⁽²⁾	+ ¹ + ² + ²	+ ^(1,666667)	+ ¹ + ⁴ + ⁶	+ ^(3,666667)
Direto	Tioglicolato	- - -	-	- - -	-	- + ¹ -	+ ^(0,333333)	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ¹⁰ + ⁶	+ ⁽⁸⁾	+ ²⁶ + ⁴	+ ⁽¹⁵⁾	+ ³ + ¹	+ ⁽²⁾	- -	-
Indireto convencional	Clausen	+ ¹⁷ + ¹¹	+ ⁽¹⁴⁾	+ ⁴ + ⁴	+ ⁽⁴⁾	- + ¹	+ ^(0,5)	+ ⁴ -	+ ⁽²⁾
Indireto convencional	Sabouraud	- + ⁵	+ ^(2,5)	+ ⁴ + ⁴	+ ⁽⁴⁾	+ ³ + ¹	+ ⁽²⁾	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ¹³ + ⁷	+ ⁽¹⁰⁾	- + ⁴	+ ⁽²⁾	+ ³ + ¹	+ ⁽²⁾	- -	-
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ⁹ + ⁹	+ ⁽⁹⁾	+ ³ + ⁴	+ ^(3,5)	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Clausen	+ ¹⁶ + ¹⁶	+ ⁽¹⁶⁾	- + ⁶	+ ⁽³⁾	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Sabouraud	+ ⁹ + ⁹	+ ⁽⁹⁾	+ ² + ³	+ ^(2,5)	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- + ⁹	+ ^(4,5)	+ ³ + ⁴	+ ^(3,5)	- -	-	- -	-

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 25 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), com nível de contaminação de 50 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	+ ¹⁵ + ¹⁴ + ¹³	+(14)	+ ⁴ + ¹¹ + ⁴	+(6,333333)	+ ³ + ² + ²	+(2,333333)	- - -	-
Direto	Clausen	- + ¹⁴ -	+(4,666667)	- - -	-	- + ² -	+(0,666667)	- - -	-
Direto	Sabouraud	- + ¹⁴ + ¹³	+(9)	+ ³ + ² + ³	+(2,666667)	+ ² + ² + ²	+(2)	+ ² + ⁵ + ⁴	+(3,666667)
Direto	Tioglicolato	- + ¹⁴ -	+(4,666667)	+ ⁴ + ⁵ + ⁴	+(4,333333)	- + ² -	+(0,666667)	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	+ ⁸ + ⁵	+(6,5)	+ ² + ⁴	+(3)	+ ¹ + ¹	+(1)	- + ⁴	+(2)
Indireto convencional	Clausen	+ ¹³ + ¹¹	+(12)	+ ⁴ + ³	+(3,5)	+ ¹ + ¹	+(1)	- -	-
Indireto convencional	Sabouraud	+ ⁶ + ⁵	+(5,5)	+ ² + ⁴	+(3)	+ ¹ + ¹	+(1)	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	+ ⁸ + ⁶	+(7)	+ ² + ⁴	+(3)	+ ¹ + ¹	+(1)	- -	-
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	+ ⁹ + ⁸	+(8,5)	+ ² + ²	+(2)	+ ⁹ + ⁶	+(7,5)	- -	-
Indireto sist. fechado	Clausen	+ ¹⁶ + ¹⁵	+(15,5)	+ ⁶ + ²	+(4)	+ ⁴ -	+(2)	+ ⁹ -	+(4,5)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	+ ⁹ + ⁶	+(7,5)	+ ² + ²	+(2)	+ ⁹ + ⁵	+(7)	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	+ ⁹ + ⁶	+(7,5)	+ ² + ²	+(2)	- -	-	- -	-

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
 +^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
 +^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 26 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), com nível de contaminação de 5 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12	22	32	42				
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - -	-	+ ¹¹ - + ²	+(4,333333)	- + ¹ -	+(0,333333)	+ ³ + ³ -	+(2)
Direto	Clausen	- - -	-	+ ¹⁴ + ¹⁴ + ¹⁵	+(14,33333)	+ ³ + ³ + ⁴	+(3,333333)	- - + ⁴	+(1,333333)
Direto	Sabouraud	- - -	-	- - -	-	- - -	-	- - -	-
Direto	Tioglicolato	- - -	-	- - -	-	+ ² + ¹ -	+(1)	+ ⁴ + ⁴ -	+(2,666667)
Indireto convencional	Caseína de soja	- -	-	+ ⁴ + ⁵	+(4,5)	+ ⁴ + ²	+(3)	+ ⁴ -	+(2)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	+ ³ + ⁵	+(4)	- + ³	+(1,5)	+ ⁴ -	+(2)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	- -	-	+ ² + ³	+(2,5)	- + ⁷	+(3,5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	+ ⁵ + ⁶	+(5,5)	+ ² + ²	+(2)	- -	-
Indireto sist. fechado	Clausen	- + ²⁷	+(13,5)	+ ⁶ + ⁷	+(6,5)	+ ⁵ + ³	+(4)	+ ⁶ + ³	+(4,5)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	- -	-	- -	-	+ ⁹ + ⁶	+(7,5)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 27 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), com nível de contaminação de 10 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- + ¹⁹ + ¹⁷	+ (12)	+ ³ - + ¹⁹	+ (7,333333)	+ ² + ² -	+ (1,333333)	- - -	-
Direto	Clausen	- + ¹⁹ + ¹⁷	+ (12)	+ ² + ² -	+ (1,333333)	+ ³ + ² + ³	+ (2,666667)	- - -	-
Direto	Sabouraud	- - -	-	+ ² - -	+ (0,666667)	- + ⁴ -	+ (1,333333)	- - -	-
Direto	Tioglicolato	- - -	-	+ ² + ² -	+ (1,333333)	+ ⁶ - -	+ (2)	- - -	-
Indireto convencional	Caseína de soja	- -	-	+ ² + ²	+ (2)	+ ¹ + ²	+ (1,5)	+ ¹ + ²	+ (1,5)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	+ ³ + ²	+ (2,5)	+ ² + ²	+ (2)	+ ² + ²	+ (2)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- -	-	+ ³ + ²	+ (2,5)	+ ¹ + ²	+ (1,5)	+ ² + ²	+ (2)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	+ ³ + ⁴	+ (3,5)	+ ¹ + ⁶	+ (3,5)	+ ¹ -	+ (0,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	- -	-	+ ⁴ + ⁹	+ (6,5)	- + ⁶	+ (3)	+ ² + ⁶	+ (4)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	+ ² + ⁵	+ (3,5)	+ ¹ + ⁶	+ (3,5)	+ ¹ -	+ (0,5)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 28 – Resultados obtidos para os testes de esterilidade utilizando-se uma suspensão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), com nível de contaminação de 50 UFC/unidade.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO (°C)							
		12		22		32		42	
		RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO	RESULTADO OBSERVADO	MÉDIA DO TEMPO
Direto	Caseína de soja	- - + ¹⁷	+(5,666667)	+ ² - + ¹	+(1)	+ ¹ + ² + ¹	+(1,333333)	- - + ¹	+(0,333333)
Direto	Clausen	- + ²⁰ + ¹⁷	+(12,33333)	+ ² + ² + ¹	+(1,666667)	+ ² + ² + ¹	+(1,666667)	- - -	-
Direto	Sabouraud	- - -	-	+ ² - -	+(0,666667)	+ ⁴ + ⁴ -	+(2,666667)	- - -	-
Direto	Tioglicolato	- + ¹⁷ + ²⁰	+(12,33333)	+ ² + ² + ¹	+(1,666667)	+ ² - + ⁴	+(2)	+ ¹⁴ - + ¹	+(5)
Indireto convencional	Caseína de soja	- + ²⁰	+(10)	+ ³ + ²	+(2,5)	+ ¹ + ¹	+(1)	+ ¹ + ¹	+(1)
Indireto convencional	Clausen	- -	-	+ ⁴ + ²	+(3)	+ ³ + ¹	+(2)	+ ¹ + ¹	+(1)
Indireto convencional	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto convencional	Tioglicolato	- + ¹⁵	+(7,5)	+ ³ + ²	+(2,5)	+ ¹ + ²	+(1,5)	+ ² + ¹	+(1,5)
Indireto sist. fechado	Caseína de soja	- -	-	+ ² + ⁶	+(4)	+ ¹ + ²	+(1,5)	+ ¹ -	+(0,5)
Indireto sist. fechado	Clausen	- + ²⁶	+(13)	+ ² + ⁶	+(4)	+ ¹ + ³	+(2)	+ ¹ + ³	+(2)
Indireto sist. fechado	Sabouraud	- -	-	- -	-	- -	-	- -	-
Indireto sist. fechado	Tioglicolato	- -	-	+ ² + ⁶	+(4)	+ ¹ + ²	+(1,5)	+ ¹ + ²	+(1,5)

- Não verificado crescimento microbiano durante período de incubação
+^a Verificado crescimento microbiano após (a) dias de incubação
+^(b) Média do tempo necessário para visualização do crescimento microbiano

Foram verificados os percentuais de evidência de contaminação, segundo:

- ❖ O método de inoculação empregado (Tabela 29 e Figura 7)
- ❖ Os níveis de contaminação (Tabela 30 e Figura 8)
- ❖ O microrganismo empregado como contaminante intencional (Tabela 31 e Figura 9)
- ❖ O meio de cultura empregado (Tabela 32 e Figura 10)
- ❖ A temperatura de incubação empregada (Tabela 33 e Figura 11)

A seguir foram verificadas, comparativamente, as freqüências de evidência de crescimento microbiano entre as variáveis estudadas, segundo:

- ❖ O método de teste empregado e o tipo de meio de cultura (Tabela 34 e Figura 12)
- ❖ O método de teste empregado e a temperatura de incubação (Tabela 35 e Figura 13)
- ❖ O método de teste empregado e o nível de contaminação das unidades (Tabela 36 e Figura 14);
- ❖ O microrganismo contaminante e o nível de contaminação das unidades (Tabela 37 e Figura 15);
- ❖ O meio de cultura e o nível de contaminação das unidades (Tabela 38 e Figura 16);

- ❖ O microrganismo contaminante e o meio de cultura (Tabela 39 e Figura 17);
- ❖ O microrganismo contaminante e a temperatura de incubação (Tabela 40 e Figura 18).

TABELA 29 – Diferença na detecção de contaminantes nos diferentes métodos de inoculação empregados

Método de inoculação	Evidência de contaminação		Total
	Não	Sim	
Direto	711 (55%)	585 (45%)	1296
Indireto convencional	393 (45%)	471 (55%)	864
Indireto em sistema fechado	415 (48%)	449 (52%)	864
Total	1519	1505	3024

FIGURA 7 – Distribuição dos ensaios segundo o método de inoculação empregado

TABELA 30 – Diferença na detecção de contaminação nos diferentes níveis de contaminação empregados

Nível de contaminação	Evidência de contaminação		Total
	Não	Sim	
05 UFC	654 (65%)	354 (35%)	1008
10 UFC	530 (53%)	478 (47%)	1008
50 UFC	335 (33%)	673 (67%)	1008
Total	1519	1505	3024

FIGURA 8 – Distribuição dos ensaios segundo o nível de contaminação empregado

TABELA 31 – Diferença na detecção de contaminação dos diferentes microrganismos contaminantes

Microrganismo Contaminante	Evidência de contaminação		Total
	Não	Sim	
<i>Aspergillus niger</i>	184 (55%)	152 (45%)	336
<i>Bacillus subtilis</i>	119 (35%)	217 (65%)	336
<i>Candida albicans</i>	114 (34%)	222 (66%)	336
<i>Clostridium sporogenes</i>	270 (80%)	66 (20%)	336
<i>Escherichia coli</i>	151 (45%)	185 (55%)	336
<i>Micrococcus luteus</i>	193 (57%)	143 (43%)	336
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	136 (40%)	200 (60%)	336
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	173 (51%)	163 (49%)	336
<i>Staphylococcus aureus</i>	179 (53%)	157 (47%)	336
Total	1519	1505	3024

FIGURA 9 – Distribuição dos ensaios segundo o microrganismo contaminante

TABELA 32 – Diferença na detecção de contaminação nos diferentes meios de cultura empregados

Meio de cultura	Evidência de contaminação		Total
	Não	Sim	
Meio de tioglicolato	337 (45%)	419 (55%)	756
Meio de caseína de soja	305 (40%)	451 (60%)	756
Meio Sabouraud	505 (67%)	251 (33%)	756
Meio Clausen	372 (49%)	384 (51%)	756
Total	1519	1505	3024

FIGURA 10 – Distribuição dos ensaios segundo o meio de cultura empregado

TABELA 33 – Diferença na detecção de contaminação nas diferentes temperaturas de incubação empregadas

Temperatura de incubação	Evidência de contaminação		Total
	Não	Sim	
12 °C	496 (66%)	260 (34%)	756
22 °C	266 (35%)	490 (65%)	756
32 °C	304 (40%)	452 (60%)	756
42 °C	453 (60%)	303 (40%)	756
Total	1505	1519	3024

FIGURA 11 – Distribuição dos ensaios segundo a temperatura de incubação empregada

TABELA 34 – Diferença na detecção de contaminação dos diferentes métodos de inoculação do teste, em diferentes tipos de meios de cultura

Método de inoculação	Meio de cultura				Total
	Caseína	Clausen	Sabouraud	Tioglicolato	
Direto	169 (29%)	156 (27%)	107 (18%)	153 (26%)	585
Indireto convencional	147 (31%)	115 (25%)	66 (14%)	143 (30%)	471
Indireto em sistema fechado	135 (30%)	113 (25%)	78 (18%)	123 (27%)	449
Total	451	384	273	419	1505

FIGURA 12 – Distribuição dos ensaios segundo o método de inoculação empregado no teste e o tipo de meio de cultura

TABELA 35 – Diferença na detecção de contaminação dos diferentes métodos de inoculação do teste, em diferentes temperaturas de incubação.

Método de inoculação	Temperatura de incubação (°C)				Total
	12	22	32	42	
Direto	104 (18%)	198 (34%)	183 (31%)	100 (17%)	585
Indireto convencional	80 (17%)	148 (31%)	141 (30%)	102 (22%)	471
Indireto em sistema fechado	76 (17%)	144 (32%)	128 (29%)	101 (22%)	449
Total	260	490	452	303	1505

FIGURA 13 – Distribuição dos ensaios segundo o método de inoculação empregado no teste e a temperatura de incubação

TABELA 36 – Diferença na detecção de contaminação dos diferentes métodos de inoculação do teste, em diferentes níveis de contaminação

Método de inoculação	Nível de contaminação (UFC/unidade)			Total
	5	10	50	
Direto	136 (23%)	177 (30%)	272 (47%)	585
Indireto convencional	113 (24%)	160 (34%)	198 (42%)	471
Indireto em sistema fechado	105 (23%)	141 (31%)	203 (45%)	449
Total	354	478	673	1505

FIGURA 14 – Distribuição dos ensaios segundo o método de inoculação empregado no teste e o nível de contaminação das unidades

TABELA 37 – Diferença na detecção de contaminação dos diferentes níveis de contaminação de diferentes microrganismos contaminantes

Microrganismo contaminante	Nível de contaminação (UFC/unidade)			Total
	5	10	50	
<i>Aspergillus niger</i>	39 (26%)	39 (26%)	74 (49%)	152
<i>Bacillus subtilis</i>	54 (25%)	63 (29%)	100 (46%)	217
<i>Candida albicans</i>	42 (19%)	80 (36%)	100 (45%)	222
<i>Clostridium sporogenes</i>	14 (21%)	24 (36%)	28 (42%)	66
<i>Escherichia coli</i>	48 (26%)	63 (34%)	74 (40%)	185
<i>Micrococcus luteus</i>	24 (17%)	45 (31%)	74 (52%)	143
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55 (28%)	61 (31%)	84 (42%)	200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37 (23%)	52 (32%)	74 (45%)	163
<i>Staphylococcus aureus</i>	41 (26%)	51 (32%)	65 (41%)	157
Total	354	478	673	1505

FIGURA 15 – Distribuição dos ensaios segundo o microrganismo contaminante e o nível de contaminação das unidades

TABELA 38 – Diferença na detecção de contaminação dos diferentes níveis de contaminação em diferentes meios de cultura

Meio de cultura	Nível de contaminação (UFC/unidade)			Total
	5	10	50	
Meio de tioglicolato	88 (21%)	138 (33%)	193 (46%)	419
Meio de caseína de soja	115 (25%)	148 (33%)	188 (42%)	451
Meio Sabouraud	59 (24%)	78 (31%)	114 (45%)	251
Meio Clausen	92 (24%)	114 (30%)	178 (46%)	384
Total	354	478	673	1505

FIGURA 16 – Distribuição dos ensaios segundo o meio de cultura empregado e o nível de contaminação das unidades

TABELA 39 – Diferença na detecção de contaminação dos diferentes meios de cultura, de diferentes microrganismos contaminantes

Microrganismo contaminante	Meio de cultura				Total
	Tioglicolato	Caseína	Sabouraud	Clausen	
<i>Aspergillus niger</i>	42 (28%)	43 (28%)	43 (28%)	24 (16%)	152
<i>Bacillus subtilis</i>	58 (27%)	75 (35%)	28 (13%)	56 (26%)	217
<i>Candida albicans</i>	49 (22%)	64 (29%)	61 (27%)	48 (22%)	222
<i>Clostridium sporogenes</i>	31 (47%)	1 (2%)	2 (3%)	32 (48%)	66
<i>Escherichia coli</i>	57 (31%)	57 (31%)	18 (10%)	53 (29%)	185
<i>Micrococcus luteus</i>	40 (28%)	53 (37%)	20 (14%)	30 (21%)	143
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67 (34%)	68 (34%)	13 (7%)	52 (26%)	200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30 (18%)	40 (25%)	61 (37%)	32 (20%)	163
<i>Staphylococcus aureus</i>	45 (29%)	50 (32%)	5 (3%)	57 (36%)	157
Total	419	451	251	384	1505

FIGURA 17 – Distribuição dos ensaios segundo o microrganismo contaminante empregado e o meio de cultura

TABELA 40 – Diferença na detecção de contaminação das diferentes temperaturas de incubação, dos diferentes microrganismos contaminantes

Microrganismo contaminante	Temperatura de incubação				Total
	12 °C	22 °C	32 °C	42 °C	
<i>Aspergillus niger</i>	10 (7%)	57 (38%)	50 (33%)	35 (23%)	152
<i>Bacillus subtilis</i>	50 (23%)	60 (28%)	54 (25%)	53 (24%)	217
<i>Candida albicans</i>	60 (27%)	63 (28%)	59 (27%)	40 (18%)	222
<i>Clostridium sporogenes</i>	1 (2%)	23 (35%)	24 (36%)	18 (27%)	66
<i>Escherichia coli</i>	4 (2%)	69 (37%)	61 (33%)	51 (28%)	185
<i>Micrococcus luteus</i>	23 (16%)	51 (36%)	51 (36%)	18 (13%)	143
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46 (23%)	59 (30%)	57 (29%)	38 (19%)	200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53 (33%)	55 (34%)	41 (25%)	14 (9%)	163
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 (8%)	53 (34%)	55 (35%)	36 (23%)	157
Total	260	490	452	303	1505

FIGURA 18 – Distribuição dos ensaios segundo o microrganismo contaminante empregado e a temperatura de incubação

Aplicou-se a seguir testes Qui-quadrado objetivando detectar diferenças nas porcentagens de evidência de contaminação entre as variáveis estudadas (Tabela 41).

TABELA 41 – Resultados dos testes Qui-quadrado

VARIÁVEL	QUI- QUADRADO	GRAUS DE LIBERDADE	P
Método de inoculação	20,565	2	0,0001 [*]
Nível de contaminação	205,245	2	0,0001 [*]
Microrganismo contaminante	214,952	8	0,0001 [*]
Meio de cultura	122,557	3	0,0001 [*]
Temperatura de incubação	198,717	3	0,0001 [*]
Método de inoculação X Nível de contaminação	2,420	4	0,6591 ^{N/S}
Microrganismo contaminante X Nível de contaminação	16,069	16	0,4482 ^{N/S}
Meio de cultura X Nível de contaminação	4,163	6	0,6547 ^{N/S}
Microrganismo contaminante X Meio de cultura	190,989	24	0,0001 [*]
Microrganismo contaminante X Temperatura de incubação	134,369	24	0,0001 [*]

^{N/S} Não significante

^{*} Significante a 1%

Em seguida, para as amostras que evidenciaram crescimento microbiano, foram calculados as médias e desvios-padrão do tempo necessário para a visualização deste crescimento. Os valores do tempo (em dias) foram transformados aplicando-se $\log_{10}$, para que os dados apresentassem Distribuição Normal e possibilitassem a aplicação de análise de variância (modelo misto), com a finalidade de verificar-se a significância nas interações entre as variáveis estudadas (Tabela 42).

TABELA 42 – Resultados da análise de variância

FONTE DE VARIABILIDADE	GRAUS DE LIBERDADE NO NUMERADOR	F	p
Microrganismo contaminante	8	16,69	0,0001*
Temperatura de incubação	3	154,34	0,0001*
Meio de cultura	3	3,37	0,0180*
Nível de contaminação	2	22,17	0,0001*
Método de inoculação	2	5,61	0,0037*
Meio de cultura	3	3,37	0,0180*
Método de inoculação X Nível de contaminação	4	2,59	0,0352*
Método de inoculação X Temperatura de incubação	6	2,47	0,0222*
Método de inoculação X Microrganismo contaminante	16	7,07	0,0001*
Método de inoculação X Meio de cultura	6	3,68	0,0012*
Nível de contaminação X Temperatura de incubação	6	1,30	0,2536 ^{N/S}
Nível de contaminação X Microrganismo contaminante	16	2,80	0,0002*
Nível de contaminação X Meio de cultura	6	0,19	0,9797 ^{N/S}
Temperatura de incubação X Microrganismo contaminante	24	6,78	0,0001*
Temperatura de incubação X Meio de cultura	9	1,48	0,1513 ^{N/S}
Microrganismo contaminante X Meio de cultura	24	4,99	0,0001*

F Valor de F, com (x) graus de liberdade no numerador e 690 graus de liberdade no denominador

p Nível de significância

* Significante a 1%

^{N/S} Não significante

Elaboraram-se adicionalmente médias e desvios padrão do tempo necessário para visualização de crescimento considerando:

- ❖ Os microrganismos empregados como contaminante intencional (Tabela 43 e Figura 19)
- ❖ A temperatura de incubação empregada (Tabela 44 e Figura 20)
- ❖ Os tipos de meios de cultura empregados (Tabela 45 e Figura 21)
- ❖ Os níveis de inoculação empregados (Tabela 46 e Figura 22)
- ❖ Cada método de teste empregado (Tabela 47 e Figura 23)

Efetuaram-se ainda as médias e desvios padrão considerando:

- ❖ A temperatura de incubação empregada e o método de teste (Tabela 48 e Figura 24), o nível de contaminação (Tabela 49 e Figura 25), os diferentes microrganismos contaminantes (Tabela 50 e Figura 26)
- ❖ O meio de cultura empregado e o nível de contaminação (Tabela 51 e Figura 27) e a temperatura de incubação (Tabela 52 e Figura 28)
- ❖ O microrganismo contaminante e o meio de cultura empregado (Tabela 53 e Figura 29) e o nível de contaminação empregado (Tabela 54 e Figura 30)
- ❖ O método de teste empregado e os diferentes microrganismos contaminantes (Tabela 55 e Figura 31), os meios de cultura empregados (Tabela 56 e Figura 32) e o nível de contaminação empregado (Tabela 57 e Figura 33)

TABELA 43 - Médias e desvios padrão do tempo necessário para visualização do crescimento de cada tipo de microrganismo contaminante

Microrganismo Contaminante	Média	Desvio padrão	Tamanho da amostra
<i>Aspergillus niger</i>	4 dias 13 h	5 dias 13 h	152
<i>Bacillus subtilis</i>	4 dias 20 h	4 dias 20 h	217
<i>Candida albicans</i>	5 dias 23 h	4 dias 07 h	222
<i>Clostridium sporogenes</i>	4 dias 21 h	1 dia 17 h	66
<i>Escherichia coli</i>	2 dias 21 h	2 dias 17 h	185
<i>Micrococcus luteus</i>	8 dias 03 h	6 dias 13 h	143
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 dias 09 h	4 dias 09 h	200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6 dias 06 h	5 dias 16 h	163
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 dias 14 h	5 dias 09 h	157

FIGURA 19 – Média do tempo necessário para a detecção dos microrganismos contaminantes

TABELA 44 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação em cada temperatura de incubação

Temperatura de incubação	Média	Desvio padrão	Tamanho da amostra
12 °C	12 dias 18 h	5 dias 04 h	260
22 °C	4 dias 14 h	3 dias 21 h	490
32 °C	3 dias 05 h	2 dias 17 h	452
42 °C	2 dias 21 h	2 dias 07 h	303

FIGURA 20 – Média do tempo necessário para a evidência de contaminação nas diferentes temperaturas de incubação

TABELA 45 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação em cada meio de cultura empregado

Meio de cultura	Média	Desvio padrão	Tamanho da amostra
Meio de caseína de soja	5 dias 04 h	5 dias 06 h	451
Meio de Sabouraud	6 dias 02 h	5 dias 19 h	251
Meio de tioglicolato	4 dias 16 h	4 dias 01 h	419
Meio Clausen	5 dias 11 h	5 dias 01 h	384

FIGURA 21 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes de acordo com o meio de cultura empregado

TABELA 46 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação considerando os diferentes microrganismos contaminantes em cada nível de contaminação

Nível de contaminação	Média	Desvio padrão	Tamanho da amostra
05 UFC	5 dias 14 h	5 dias 02 h	354
10 UFC	5 dias 06 h	4 dias 22 h	478
50 UFC	5 dias 01 h	5 dias 30 min	673

FIGURA 22 – Média do tempo necessário para a evidência de contaminação considerando os microrganismos em cada nível de contaminação

TABELA 47 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação em cada método de inoculação empregado no teste

Método de inoculação	Média	Desvio padrão	Tamanho da amostra
Direto	5 dias 09 h	5 dias 06 h	558
Indireto convencional	4 dias 21 h	4 dias 17 h	471
Indireto em sistema fechado	5 dias 11 h	4 dias 23 h	449

FIGURA 23 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes em cada método de inoculação empregado no teste

TABELA 48 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação em cada temperatura de incubação empregada em diferentes métodos de inoculação do teste

Temperatura de Incubação	Método de inoculação					
	Direto		Indireto convencional		Indireto em sist. fechado	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
12 °C	12 dias	5 dias	12 dias	5 dias	13 dias	5 dias
	21 h	01 h		08 h	09 h	05 h
22 °C	4 dias	4 dias	4 dias	3 dias	4 dias	3 dias
	18 h	14 h	06 h	06 h	17 h	09 h
32 °C	3 dias	2 dias	3 dias	2 dias	3 dias	2 dias
	01 h	13 h	04 h	23 h	10 h	15 h
42 °C	3 dias	2 dias	2 dias	1 dia 15 h	3 dias	2 dias
	14 min	17 h	14 h	h	06 h	08 h

FIGURA 24 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes em temperatura de incubação empregada de acordo com o método de inoculação empregado

TABELA 49 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação em cada temperatura de incubação empregada em diferentes níveis de contaminação

Temperatura de Incubação	Nível de contaminação					
	5 UFC		10 UFC		50 UFC	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
12 °C	13 dias	4 dias 11 h	12 dias 20 h	4 dias 20 h	12 dias 15 h	5 dias 16 h
22 °C	5 dias 02 h	4 dias 05 h	4 dias 23 h	4 dias 06 h	3 dias 23 h	3 dias 05 h
32 °C	4 dias 04 h	4 dias 06 h	3 dias 01 h	1 dia 23 h	2 dias 18 h	1 dia 21 h
42 °C	3 dias 11 h	3 dias 05 h	2 dias 15 h	1 dia 14 h	2 dias 20 h	1 dia 23 h

FIGURA 25 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes em temperatura de incubação empregada de acordo com o nível de contaminação empregado

TABELA 50 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação dos diferentes microrganismos contaminantes em cada temperatura de incubação

Microrganismo contaminante	Temperatura de incubação							
	12°C		22°C		32°C		42°C	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
<i>Aspergillus niger</i>	23 dias 19 h	2 dias 07 h	3 dias 21 h	2 dias 12 h	2 dias 14 h	1 dia 09 h	2 dias 22 h	1 dia 19 h
<i>Bacillus subtilis</i>	9 dias 14h	3 dias 12 h	5 dias 06 h	4 dias 20 h	2 dias 16 h	4 dias 01 h	2 dias 03 h	2 dias 20 h
<i>Candida albicans</i>	11 dias 14 h	2 dias 05 h	3 dias 23 h	3 dias 09 h	4 dias 30 min	2 dias 20 h	3 dias 17 h	1 dia 06 h
<i>Clostridium sporogenes</i>	6 dias	----	5 dias 05 h	1 dia 23h	5 dias 04 h	1 dia 19 h	3 dias 22 h	19 h
<i>Escherichia coli</i>	16 dias 06 h	3 dias 05 h	3 dias 10 h	2 dias 05 h	2 dias 05 h	1 dia 08 h	1 dia 21 h	23 h
<i>Micrococcus luteus</i>	17 dias 18 h	6 dias 20 h	8 dias 14 h	5 dias 22 h	4 dias 08 h	2 dias 04 h	5 dias 07 h	1 dia 13 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 dias 56 h	3 dias 08 h	4 dias 01 h	2 dias 06 h	3 dias 11 h	2 dias 17 h	2 dias 21 h	2 dias 21 h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12 dias 03 h	4 dias 20 h	3 dias 19 h	3 dias 10 h	2 dias 22 h	3 dias 21 h	3 dias 17 h	2 dias 05 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	19 dias 07 h	3 dias 13h	4 dias 06 h	3 dias 210 h	2 dias 11 h	1 dia 11 h	2 dias 23 h	2 dias 18 h

FIGURA 26 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes nas diferentes temperaturas de incubação

TABELA 51 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização dos diferentes níveis de contaminação empregados em diferentes meios de cultura

Meio de cultura	Nível de contaminação					
	5 UFC		10 UFC		50 UFC	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Meio de tioglicolato	4 dias	3 dias	4 dias	3 dias	4 dias	4 dias
	20 h	23 h	15 h	15 h	16 h	08 h
Meio de caseína de soja	5 dias	5 dias	5 dias	5 dias	4 dias	5 dias
	15 h	05 h	01 h	06 h	23 h	06 h
Meio de Sabouraud	5 dias	5 dias	6 dias	6 dias	5 dias	5 dias
	21 h	12 h	14 h	02 h	20 h	19 h
Meio Clausen	6 dias	5 dias	5 dias	4 dias	4 dias	5 dias
	03 h	14 h	11 h	18 h	22 h	02 h

FIGURA 27 – Média do tempo necessário para a evidência dos diferentes níveis de contaminação empregados de acordo com o meio de cultura utilizado.

TABELA 52 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação em cada temperatura de incubação empregada em diferentes meios de cultura

Meio de Cultura	Temperatura de incubação							
	12°C		22°C		32°C		42°C	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Meio de Caseína de soja	12 dias 22 h	5 dias 12 h	4 dias 08 h	3 dias 10 h	2 dias 22 h	3 dias 01 h	2 dias 11 h	2 dias 09 h
Meio Sabouraud	12 dias 18h	5 dias 09 h	5 dias 17 h	6 dias 04 h	3 dias 17 h	3 dias 06 h	3 dias 23 h	2 dias 23 h
Meio de tioglicolato	11 dias 19 h	4 dias 09 h	3 dias 21 h	2 dias 02 h	2 dias 22 h	1 dia 18 h	3 dias 03 h	2 dias 06 h
Meio Clausen	13 dias 14 h	5 dias 09h	4 dias 19 h	3 dias 11 h	3 dias 10 h	2 dias 16 h	2 dias 18 h	1 dia 13 h

FIGURA 28 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes em temperatura de incubação empregada de acordo com o meio de cultura empregado

TABELA 53 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação dos diferentes microrganismos contaminantes em cada tipo de meio de cultura utilizado

Microrganismo contaminante	Meio de cultura							
	Caseína		Sabouraud		Tioglicolato		Clausen	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
<i>Aspergillus niger</i>	4 dias 23 h	6 dias 13 h	4 dias 19 h	6 dias 06 h	3 dias 19 h	4 dias 15 h	4 dias 16 h	3 dias 09 h
<i>Bacillus subtilis</i>	3 dias 22 h	4 dias 04 h	9 dias 06 h	7 dias 22 h	4 dias 18 h	4 dias 01 h	3 dias 23 h	3 dias 02 h
<i>Candida albicans</i>	6 dias 10 h	4 dias 19 h	5 dias 07 h	3 dias 13 h	6 dias 01 h	4 dias 04 h	6 dias 06 h	4 dias 16 h
<i>Clostridium sporogenes</i>	8 dias	----	4 dias 12 h	17 h	4 dias 16 h	1 dia 17 h	4 dias 23 h	1 dia 17 h
<i>Escherichia coli</i>	2 dias 11 h	1 dia 19 h	4 dias 21 h	3 dias 14 h	2 dias 11 h	2 dias 12 h	3 dias 01 h	3 dias 02 h
<i>Micrococcus luteus</i>	7 dias 22 h	6 dias 23 h	11 dias 13 h	7 dias 14 h	6 dias 12 h	4 dias 05 h	8 dias 10 h	6 dias 22 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 dias 06 h	4 dias 13 h	7 dias 13 h	6 dias 06 h	4 dias 22 h	3 dias 10 h	5 dias 14 h	4 dias 16 h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6 dias 19 h	5 dias 16 h	4 dias 19 h	4 dias 17 h	5 dias 23 h	5 dias 03 h	8 dias 17 h	7 dias 01 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 dias 03 h	5 dias 04 h	3 dias 05 h	1 dia 02 h	3 dias 23 h	4 dias 10 h	5 dias 13 h	6 dias 7 h

FIGURA 29 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes nos diferentes meios de cultura

TABELA 54 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação individual dos diferentes microrganismos contaminantes em cada nível de contaminação

Microrganismo Contaminante	Nível de contaminação					
	5 UFC		10 UFC		50 UFC	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
<i>Aspergillus niger</i>	4 dias 02 h	4 dias 19 h	3 dias 02 h	1 dia 18 min	5 dias 14 h	7 dias 02 h
<i>Bacillus subtilis</i>	5 dias 03 h	5 dias 10 h	5 dias 12 h	5 dias 12 h	4 dias 06 min	3 dias 23 h
<i>Candida albicans</i>	7 dias 05 h	4 dias 21 h	6 dias 08 h	4 dias 14 h	5 dias 05 h	3 dias 16 h
<i>Clostridium sporogenes</i>	5 dias 07 h	2 dias 05 h	5 dias 02 h	1 dia 15 h	4 dias 11 h	1 dia 12 h
<i>Escherichia coli</i>	2 dias 22 h	2 dias 09 h	2 dias 15 h	2 dias 03 h	3 dias 01 h	3 dias 07 h
<i>Micrococcus luteus</i>	6 dias 10 h	3 dias 07 h	8 dias 14 h	6 dias 22 h	8 dias 10 h	7 dias 30 min
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 dias 14 h	5 dias 15 h	5 dias 06 h	4 dias 01 h	4 dias 16 h	3 dias 12 h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7 dias 19 h	7 dias 08 h	6 dias 08 h	5 dias 23 h	5 dias 11 h	4 dias 07 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 dias 09 h	4 dias 20 h	4 dias 06 h	4 dias 22 h	4 dias 07 h	5 dias 23 h

FIGURA 30 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes, de forma individualizada, em diferentes níveis de contaminação

TABELA 55 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização dos microrganismos contaminantes em diferentes métodos de inoculação do teste

Microrganismo contaminante	Método de inoculação					
	Direto		Indireto convencional		Indireto em sistema fechado	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
<i>Aspergillus niger</i>	4 dias 03 h	2 dias 02 h	4 dias 05 h	5 dias 19 h	5 dias 04 h	6 dias 17 h
<i>Bacillus subtilis</i>	4 dias 16 h	4 dias 16 h	3 dias 22 h	3 dias 15 h	5 dias 23 h	5 dias 22 h
<i>Candida albicans</i>	5 dias 03 h	4 dias 13 h	6 dias 20 h	4 dias 09 h	6 dias 08 h	3 dias 17 h
<i>Clostridium sporogenes</i>	4 dias 23 h	2 dias 14 h	4 dias 17 h	17 h	4 dias 22 h	1 dia 02 h
<i>Escherichia coli</i>	2 dias 23 h	3 dias 11 h	2 dias 23 h	1 dia 22 h	2 dias 14 h	1 dia 21 h
<i>Micrococcus luteus</i>	8 dias 20 h	7 dias 05 h	7 dias 18 h	6 dias 11 h	7 dias 03 h	4 dias 22 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 dias 13 h	4 dias 13 h	5 dias 03 h	4 dias 14 min	5 dias 09 h	4 dias 12 h
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6 dias 04 h	6 dias 04 h	5 dias 18 h	5 dias 20 h	7 dias 01 h	4 dias 18 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 dias 21 h	6 dias 10 h	2 dias 23 h	3 dias 07 h	4 dias 13 h	5 dias 06 h

FIGURA 31 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes de acordo com o método de inoculação empregado no teste

TABELA 56 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização da contaminação em cada meio de cultura empregado em diferentes métodos de inoculação do teste

Meio de cultura	Método de inoculação					
	Direto		Indireto convencional		Indireto em sist. fechado	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Meio de caseína de soja	5 dias 11 h	5 dias 12 h	5 dias 024 h	5 dias 09 h	4 dias 20 h	4 dias 17 h
Meio Sabouraud	6 dias 12 h	6 dias 07 h	5 dias 03 h	4 dias 16 h	6 dias 07 h	5 dias 22 h
Meio de tioglicolato	4 dias 15 h	4 dias 03 h	4 dias 12 h	4 dias 30 min	4 dias 23 h	3 dias 22 h
Meio Clausen	5 dias 05 h	5 dias 02 h	4 dias 23 h	4 dias 14 h	6 dias 06 h	5 dias 09 h

FIGURA 32 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes em cada meio de cultura empregado de acordo com o método de inoculação do teste

TABELA 57 - Médias e desvios padrão do tempo para visualização dos diferentes níveis de contaminação em diferentes métodos de inoculação do teste

Nível de contaminação	Método de inoculação					
	Direto		Indireto		Indireto em sist. fechado	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
05 UFC	5 dias 06 h	4 dias 23 h	5 dias 14 h	5 dias 02 h	6 dias 14 min	5 dias 06 h
10 UFC	5 dias 17 h	5 dias 12 h	4 dias 12 h	4 dias 11 h	5 dias 13 h	4 dias 11 h
50 UFC	5 dias 05 h	5 dias 06 h	4 dias 18 h	4 dias 15 h	5 dias 04 h	5 dias 02 h

FIGURA 33 – Média do tempo necessário para a evidência dos microrganismos contaminantes em cada nível de contaminação empregado de acordo com o método de inoculação do teste

Foram verificadas as frequências de evidência de contaminação nos periodos de incubação de até 7 dias, entre 8 e 14 dias e entre 15 e 28 dias, considerando:

- ❖ Todos os resultados obtidos (Tabela 58 e Figura 34)
- ❖ O método de inoculação empregado (Tabela 59 e Figura 35)
- ❖ O método de inoculação e os diferentes níveis de contaminação empregados (Tabela 60 e Figura 36)
- ❖ As diferentes temperaturas de incubação empregadas (Tabela 61 e Figura 37)
- ❖ As diferentes temperaturas de incubação e o método de inoculação empregado (Tabela 62 e Figura 38)
- ❖ As diferentes temperaturas de incubação e os meios de cultura empregados (Tabela 63 e Figura 39)

TABELA 58 – Diferença na detecção de contaminantes em três períodos de incubação

Período de incubação			Total
Até 7 dias	Entre 8 e 14 dias	Entre 15 e 28 dias	
1211 (81%)	198 (13%)	96 (6%)	1505

FIGURA 34 – Distribuição dos ensaios de acordo com o tempo de incubação necessário para visualização do crescimento microbiano

TABELA 59 – Diferença na detecção de contaminantes em três períodos de incubação de acordo com os métodos de inoculação empregados

Método de inoculação	Período de incubação			Total
	Até 7 dias	Entre 8 e 14 dias	Entre 15 e 28 dias	
Direto	461 (79%)	78 (13%)	46 (8%)	585
Indireto convencional	393 (83%)	55 (12%)	23 (5%)	471
Indireto em sistema fechado	357 (80%)	65 (14%)	27 (6%)	449
Total	1211 (81%)	198 (13%)	96 (6%)	1505

FIGURA 35 – Distribuição dos ensaios segundo o método de inoculação empregado e o tempo de incubação necessário para a detecção da contaminação

TABELA 60 – Diferença na detecção de contaminantes em três períodos de incubação de acordo com os métodos de inoculação e os níveis de contaminação empregados

Método de inoculação		Período de incubação			Total
Nível de contaminação		Até 7 dias	Entre 8 e 14 dias	Entre 15 e 28 dias	
Direto					
	05 UFC	106 (78%)	20 (15%)	10 (7%)	136
	10 UFC	138 (78%)	22 (12%)	17 (10%)	177
	50 UFC	217 (80%)	36 (13%)	19 (7%)	272
Indireto convencional					
	05 UFC	87 (77%)	20 (18%)	6 (5%)	113
	10 UFC	139 (87%)	16 (10%)	5 (3%)	160
	50 UFC	167 (84%)	19 (10%)	12 (6%)	198
Indireto em sistema fechado					
	05 UFC	83 (79%)	15 (14%)	7 (7%)	105
	10 UFC	111 (79%)	22 (16%)	8 (6%)	141
	50 UFC	163 (80%)	28 (14%)	12 (6%)	203
	Total	1211 (81%)	198 (13%)	96 (6%)	1505

FIGURA 36 – Distribuição dos ensaios segundo o método de inoculação empregado, o nível de contaminação e o tempo de incubação necessário para a detecção da contaminação

TABELA 61 – Diferença na detecção de contaminantes em três períodos de incubação de acordo com as temperaturas de incubação empregadas

Temperatura de incubação	Período de incubação			Total
	Até 7 dias	Entre 8 e 14 dias	Entre 15 e 28 dias	
12 °C	40 (15%)	147 (57%)	73 (28%)	260
22 °C	443 (91%)	30 (6%)	17 (3%)	490
32 °C	433 (96%)	15 (3%)	4 (1%)	452
42 °C	295 (97%)	6 (2%)	2 (1%)	303
Total	1211 (81%)	198 (13%)	96 (6%)	1505

FIGURA 37 – Distribuição dos ensaios segundo a temperatura de incubação empregada e o tempo de incubação necessário para a detecção da contaminação

TABELA 62 – Diferença na detecção de contaminantes em três períodos de incubação de acordo com a temperatura de incubação e os métodos de inoculação empregados

Método de Inoculação	Temperatura	Período de incubação			Total
		Até 7 dias	Entre 8 e 14 dias	Entre 15 e 28 dias	
Direto	12°C	18 (17%)	53 (51%)	33 (32%)	104
	22°C	172 (87%)	15 (7%)	11 (6%)	198
	32°C	175 (95%)	7 (4%)	1 (1%)	183
	42°C	96 (96%)	3 (3%)	1 (1%)	100
Indireto convencional	12°C	18 (23%)	44 (54%)	18 (23%)	80
	22°C	139 (94%)	6 (4%)	3 (2%)	148
	32°C	135 (96%)	4 (3%)	2 (1%)	141
	42°C	101 (99%)	1 (1%)	0 (0%)	102
Indireto em sistema fechado	12°C	4 (5%)	50 (66%)	22 (29%)	76
	22°C	132 (92%)	9 (6%)	3 (2%)	144
	32°C	123 (96%)	4 (3%)	1 (1%)	128
	42°C	98 (97%)	2 (2%)	1 (1%)	101
Total		1211 (81%)	198 (13%)	96 (6%)	1505

FIGURA 38 – Distribuição dos ensaios segundo o método de inoculação empregado, a temperatura de incubação empregada e o tempo de incubação necessário para a detecção da contaminação.

TABELA 63 – Diferença na detecção de contaminantes em três períodos de incubação de acordo com a temperatura de incubação e os tipos de meio de cultura empregados

Meio de cultura	Temperatura	Período de incubação			Total
		Até 7 dias	Entre 8 e 14 dias	Entre 15 e 28 dias	
Meio de caseína de soja	12°C	13 (16%)	49 (58%)	22 (26%)	84
	22°C	132 (92%)	8 (6%)	3 (2%)	143
	32°C	127 (95%)	6 (4%)	1 (1%)	134
	42°C	88 (98%)	1 (1%)	1 (1%)	90
Meio Clausen	12°C	7 (11%)	32 (49%)	26 (40%)	65
	22°C	113 (90%)	9 (7%)	4 (3%)	126
	32°C	114 (97%)	3 (2%)	1 (1%)	118
	42°C	74 (99%)	1 (1%)	0 (0%)	75
Meio Sabouraud	12°C	7 (16%)	26 (59%)	11 (25%)	44
	22°C	76 (83%)	6 (6%)	10 (11%)	92
	32°C	67 (90%)	5 (7%)	2 (3%)	74
	42°C	40 (98%)	0 (0%)	1 (2%)	41
Meio de tioglicolato	12°C	13 (19%)	40 (60%)	14 (21%)	67
	22°C	122 (95%)	7 (5%)	0 (0%)	129
	32°C	125 (99%)	1 (1%)	0 (0%)	126
	42°C	93 (96%)	4 (4%)	0 (0%)	97
	Total	1211 (81%)	198 (13%)	96 (6%)	1505

FIGURA 39 – Distribuição dos ensaios segundo o meio de cultura empregado, a temperatura de incubação empregada e o tempo de incubação necessário para a detecção da contaminação

7. DISCUSSÃO

A proposta do trabalho teve por meta investigar, comparativamente, as vantagens das metodologias empregando inoculação direta, inoculação indireta nos moldes convencionais e inoculação indireta em sistema fechado (Steritest[®]). De forma complementar, avaliar os benefícios reais que pudessem advir da extensão do tempo de incubação, assim como da diversidade de temperaturas, meios de cultura e cepas padrão, para isto empregadas.

As diferentes farmacopéias ^(9,28,46,48,52,65,92,106) sugerem o uso de metodologia por inoculação indireta sempre que as condições da amostra e do laboratório permitam, uma vez que por esta técnica é possível testar quantidades maiores de cada unidade, quando comparada ao método empregando inoculação direta, aumentando a representatividade da amostra. Estudos feitos por BROWN e GILBERT demonstram que o aumento do volume de cada unidade submetido ao teste de esterilidade aumenta a sensibilidade do teste. Segundo APOSTOLO ⁽¹⁰⁾, o método empregando inoculação indireta apresenta-se mais efetivo na evidência de contaminantes eventualmente presentes, em relação ao método empregando inoculação direta. A análise dos resultados obtidos permitiu verificar diferenças estatisticamente significativas ($p=0,0001$) entre as metodologias aplicadas (TABELA 41), variando de 45%, 55% e 52% para os métodos empregando inoculação direta, indireta nos moldes convencionais e indireta em sistema fechado, respectivamente (TABELA 29/FIGURA 7), apesar de terem sido utilizados, em todas as metodologias aplicadas, mesmo número de amostras bem como mesmo volume de cada uma das unidades.

Muitos autores, como COOPER ⁽³⁹⁾, BROWN e GILBERT ⁽²⁹⁾, WILSON e VARNEY ⁽¹¹³⁾, consideram que não apenas o número de unidades testadas e o volume de cada uma das unidades submetido ao

teste sejam importantes para a determinação da sensibilidade do teste de esterilidade mas, também, as condições de incubação. A análise da TABELA 34/FIGURA 12 e da TABELA 35/FIGURA 13, que mostram as frequências de evidência de contaminação de cada um dos métodos de inoculação empregados de acordo com os diferentes tipos de meio de cultura e das diferentes condições de temperatura empregadas, evidencia que as condições de incubação, no que se referem aos diferentes tipos de meios de cultura e condições de temperatura de incubação, exercem influência na eficiência de detecção de contaminação em todos os três métodos de inoculação empregados.

A menor eficiência de detectar contaminantes evidenciada para o método empregando inoculação direta em relação aos métodos empregando inoculação indireta (TABELA 29/FIGURA 7) não pode ser atribuída às condições de incubação, que influenciaram a sensibilidade dos três métodos de maneira muito semelhante (TABELA 34/FIGURA 12 e TABELA 35/FIGURA 13) e nem às condições da amostra, visto terem sido utilizados, em todas as metodologias aplicadas, o mesmo número de amostras e o mesmo volume de cada uma das unidades testadas.

A menor eficiência do método empregando inoculação direta pode ser explicada pelo fato que, neste método, ocorre diluição do produto no meio de cultura. Segundo NEGRETTI ⁽⁷⁹⁾, a diluição do produto em meio de cultura resulta na diminuição da concentração microbiana eventualmente presente a níveis tão baixos que impedem a detecção da contaminação. Assim, a diluição, inerente ao método empregando inoculação direta, torna-o menos eficiente em relação aos métodos empregando inoculação indireta.

Segundo APOSTOLO, LANZAROTTI e ZAIA ⁽⁹⁾, o método empregando inoculação indireta apresenta vantagens em relação ao método empregando inoculação direta. Tais vantagens não seriam apenas técnicas, mas também econômicas com a redução da quantidade de meios de cultura

e de vidraria empregados em torno de 85 a 90%. Embora não tenha sido feito um estudo de custo, foi possível verificar que houve grande redução da quantidade de meios de cultura e de vidraria empregados, bem como redução do tempo envolvido na execução dos ensaios, quando se empregaram métodos por inoculação indireta.

Considerando o mesmo número de amostras examinadas, é de se esperar que o aumento do nível de contaminação aumente a probabilidade do teste de esterilidade evidenciar contaminação ^(29,86,107). O estudo experimental desenvolvido efetivamente permitiu verificar um aumento significativo na evidência de detecção (TABELA 41), variando de 35%, 47% e 67%, à medida que a contaminação intencional foi crescente - 5, 10 e 50 UFC/unidade, respectivamente (TABELA 30/FIGURA 8), além de possibilitar a observação de que os diferentes métodos empregados apresentaram o mesmo comportamento em evidenciar contaminantes presentes em diferentes níveis de contaminação (TABELA 36/FIGURA 14).

BROWN e GILBERT ⁽²⁹⁾ demonstraram estatisticamente que os testes de esterilidade apenas permitem detectar, com alto grau de confiança, altos níveis de contaminação, como os que resultam de uma falha no procedimento de esterilização. Em vista disso, concluem que a garantia da qualidade deve ser estabelecida pelo conhecimento de que o produto tenha sido submetido a processos validados de produção e esterilização e não somente em decorrência de resultados satisfatórios nos testes de esterilidade.

Estudos feitos por VAN DOORNE et al ⁽¹⁰⁷⁾ demonstram que os testes de esterilidade têm pouco valor para detectar níveis baixos de contaminação, oferecendo pouca ou nenhuma segurança quanto à qualidade do produto e servindo como forte argumento em favor da liberação paramétrica. ODLAUG et al ⁽⁸⁰⁾, em estudo feito em várias indústrias americanas, indicam que os testes de esterilidade devam continuar sendo

realizados como uma ferramenta adicional para decisão sobre a liberação de produtos, embora reconheçam as limitações estatísticas inerentes à metodologia.

O número de unidades testadas e a quantidade de cada unidade que é submetida ao teste são fatores críticos na determinação da sensibilidade do teste de esterilidade. Entretanto, as condições de incubação não podem ser ignoradas ou consideradas como fatores secundários.

A maioria dos microrganismos contaminantes de produtos farmacêuticos são associados à flora bacteriana humana. WHYTE, NIVEN e BELL ⁽¹¹²⁾, além de GUYNN, PORETZ e DUMA ⁽⁵⁸⁾, que estudaram capacidade de crescimento microbiano em preparações farmacêuticas de pequeno volume, evidenciaram que os tipos de microrganismos contaminantes de soluções parenterais de pequeno volume são predominantemente bactérias Gram-negativas como membros dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, bactérias Gram-positivas, como *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*, além de leveduras, como *Candida albicans*. FRIBEN ⁽⁴⁹⁾, que estudou riscos de contaminação microbiana em ambientes assépticos e HYDE ⁽⁶¹⁾, que estudou a origem de bactérias em áreas limpas, indicam que a principal fonte de contaminação em tais ambientes é o pessoal e que a maioria dos microrganismos normalmente encontrados são do gênero *Staphylococcus* e *Micrococcus* – associados à pele, cabelos e trato respiratório – além de *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Candida*.

A validação de um teste de esterilidade deve demonstrar sua exatidão, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, garantindo a validade dos resultados obtidos, sendo isto possível apenas com o acompanhamento de controles negativos e positivos, necessários para comprovar tanto a ausência de atividade inibitória como a capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura empregados. As diversas

farmacopéias indicam cepas para avaliar a capacidade promotora do crescimento, que em geral representam microrganismos normalmente encontrados como contaminantes de produtos farmacêuticos.

BUOGO, DE PARRI, ZANUSO e MECARELLI ⁽³²⁾, em estudo sobre testes de capacidade promotora de meios de cultura utilizados em testes de esterilidade, indicam o uso de *Micrococcus luteus* e *Saccharomyces cerevisiae* em substituição de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, respectivamente, em testes de avaliação da capacidade promotora de meios de cultura. Neste estudo, tanto *Micrococcus luteus* como *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram clara superioridade, com a vantagem de não serem microrganismos patogênicos e não oferecerem risco de contaminação ambiental. Diferentemente, da análise da TABELA 31/FIGURA 9, verificou-se que *Candida albicans* (66%) efetivamente apresentou melhores resultados em relação à evidência de contaminação que *Saccharomyces cerevisiae* (49%), assim como *Staphylococcus aureus* (47%) em relação a *Micrococcus luteus* (43%).

A avaliação da capacidade promotora do crescimento dos meios de cultura trata-se de um controle indicativo de que a preparação e composição dos meios de cultura lhes conferem níveis de capacidade promotora de crescimento, que permitem o desenvolvimento de microrganismos.

As diversas farmacopéias indicam que a avaliação da capacidade promotora deve ser realizada com a inoculação de 10 a 100 UFC. CARAZZONE e FAVA ⁽³⁵⁾, em estudo sobre a fertilidade de meios de cultura empregados em testes de esterilidade, indicam que o uso de inóculos contendo 100 UFC não permite discriminar com suficiente sensibilidade a capacidade dos meios de cultura em permitir crescimento microbiano, uma vez que com esta densidade microbiana o meio de cultura resultaria sempre fértil, ainda que estivesse em condição menos favorável de conservação. BOWMAN, WHITE e CALHOUN ⁽²⁶⁾, em estudo com meios de cultura para

teste de esterilidade, utilizaram suspensões microbianas com densidades variando de 1 a 5 UFC e de 50 a 100 UFC, sendo que em muitos casos, a recuperação dos microrganismos inoculados em baixos níveis de contaminação foi muito baixa. BARZAGHI et al ⁽²⁰⁾, que estudaram o controle de fertilidade do meio de tioglicolato, utilizaram inóculos microbianos contendo 10, 10², 10³ e 10⁴ UFC e verificaram variações na evidência de crescimento com inóculos da ordem de 10 UFC. MENDES et al ⁽⁷⁶⁾, que realizaram um estudo comparativo de meios de cultura recomendados para testes de esterilidade, utilizaram inóculos contendo até 20 UFC e contendo de 20 a 50 UFC, obtendo manifestação de crescimento microbiano com os dois tipos de inóculo.

A análise da TABELA 37/FIGURA 15, que indica a porcentagem de evidência de contaminação dos diversos microrganismos em cada um dos níveis de contaminação utilizados, e da TABELA 38/FIGURA16, que indica a porcentagem de evidência de contaminação dos meios de cultura utilizados em cada um dos níveis de contaminação, permitiu verificar a adequação das cepas utilizadas na avaliação da capacidade promotora de crescimento, bem como da densidade destes inóculos, às monografias oficiais.

Como já citado, o número de unidades testadas e a quantidade de cada unidade que é submetida ao teste são fatores críticos na determinação da sensibilidade do teste de esterilidade, assim como as condições de incubação. Para correta execução do teste de esterilidade é essencial dispor-se de meios de cultura que permitam o crescimento de maior número e variedade de microrganismos eventualmente presentes no produto farmacêutico. Deve-se considerar que os contaminantes microbiológicos de um produto farmacêutico estão em um estado deficitário e em consequência, necessitam de um meio de cultura livre de substâncias que interfiram em sua capacidade de reparo e reprodução.

MENDES et al ⁽⁷⁶⁾, que realizaram um estudo comparativo de meios de cultura recomendados para teste de esterilidade, indicam que o meio de caseína de soja apresenta a mesma eficiência que o meio de tioglicolato na detecção de microrganismos aeróbios e sugerem seu uso em paralelo ao meio de tioglicolato visando a complementação dos resultados.

CLAUSEN ⁽³⁷⁾ desenvolveu e estudou as propriedades de promoção do crescimento de um meio de cultura contendo uma associação de ditionito de sódio e tioglicolato – denominado meio Clausen – em comparação com outros meios de cultura líquidos e sólidos. Este meio de cultura apresenta propriedades que permitem o desenvolvimento tanto de microrganismos anaeróbios como aeróbios, sendo sua capacidade de detecção de microrganismos aeróbios comparável à encontrada para o meio de caseína de soja.

ABDOU ⁽¹⁾, que realizou um estudo comparativo entre sete tipos de meios de cultura, verificou a superioridade do meio Clausen em evidenciar o crescimento de microrganismos quando comparado aos meios de cultura de caseína de soja e de tioglicolato.

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho indica que as capacidades de detecção dos meios de cultura tioglicolato (55%), caseína de soja (60%) e Clausen (51%) são comparáveis, enquanto que o meio Sabouraud, apresentou a menor eficiência de detecção (33%) (TABELA 32/FIGURA 10).

Tanto BOWMAN, WHYTE e CALHOUN ⁽²⁶⁾ – em estudos de meios de cultura para teste de esterilidade – como MARSHALL, POULSON-COOK e MOLDENHAUER ⁽⁷⁴⁾ – em estudos de meios de cultura utilizados em monitoramento ambiental – apontam a superioridade do meio de caseína de soja sobre o meio Sabouraud, no que diz respeito à capacidade de detecção de microrganismos aeróbios. Esta superioridade se deve ao fato do meio

Sabouraud ser bastante seletivo para detecção de fungos e, até, impedir o crescimento de certas bactérias. Os resultados obtidos (TABELA 39/FIGURA 17) evidenciaram a seletividade do meio Sabouraud na detecção de fungos, com baixa eficiência de detecção de bactérias aeróbias e demonstraram a extrema vantagem do meio de caseína de soja, que apresentou poder de detecção de fungos comparável ao meio de Sabouraud e permitiu detecção de bactérias aeróbias.

ERNST ⁽⁴⁴⁾ indica que o tioglicolato exerce ação inibitória sobre algumas cepas de *Bacillus* e *Clostridium*. Tal inibição foi comprovada por ABDU ⁽¹⁾, em estudo comparativo entre sete tipos de meios de cultura, sendo que o meio Clausen apresentou maior capacidade em promover o crescimento de cepas de *Bacillus* e *Clostridium*, quando comparado ao meio de tioglicolato. Esta maior eficiência pode ser explicada pela presença do ditionito de sódio associado ao tioglicolato, que parece impedir a ação tóxica deste sobre as cepas microbianas. Da análise dos resultados obtidos (TABELA 39/FIGURA 17), verificou-se pouca diferença entre o meio de tioglicolato (27% e 47%) e o meio Clausen (26% e 48%) na eficiência de detecção de *Bacillus subtilis* e *Clostridium sporogenes*, respectivamente.

Verificou-se crescimento de *Clostridium sporogenes* em meio de caseína de soja (2%) e em meio Sabouraud (3%), quando considerando testes de esterilidade empregando inoculação direta. Estes resultados podem ser atribuídos à possibilidade de algumas células terem sido inoculadas no fundo do tubo de ensaio, onde encontraram condição excepcional de baixa tensão de oxigênio.

Apesar de ter sido verificada pouca diferença entre o meio de tioglicolato e o meio Clausen na detecção de *Bacillus subtilis* e *Clostridium sporogenes*, o meio tioglicolato apresentou melhores resultados na evidência de detecção dos vários microrganismos contaminantes (55%) em relação ao meio Clausen (51%) (TABELA 32/FIGURA10).

Durante o período de incubação, além de fornecer nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano, é preciso que se proporcionem condições adequadas em termos de temperatura.

Segundo CAPUTO, ROHN e MASCOLI ⁽³³⁾, que estudaram o efeito da temperatura na recuperação de indicadores biológicos submetidos a doses subletais de agentes esterilizantes, a temperatura de incubação tem grande influência sobre o nível de recuperação de indicadores biológicos.

Considerando as distintas metodologias, em uma análise global, efetivamente confirmou-se que os melhores resultados foram aqueles obtidos com as condições preconizadas nos compêndios farmacopêicos: 22°C e 32°C. Nestas temperaturas, obteve-se respectivamente 65% e 60% de evidência de detecção de contaminantes, enquanto que condições extremas, 12°C e 42°C, conduziram a apenas 34% e 40%, respectivamente (TABELA 33/FIGURA 11).

A temperatura influencia a absorção de nutrientes, o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos, que apresentam características específicas quanto às temperaturas mínima, ótima e máxima de crescimento.

Como já citado, a maioria dos microrganismos contaminantes de produtos farmacêuticos estão associados à flora bacteriana humana, como os gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*, além de leveduras, como *Candida albicans*. Sendo a maioria dos microrganismos contaminantes de um produto farmacêutico mesófilos, é possível explicar a melhor eficiência em evidenciar a contaminação proporcionada pelas temperaturas de incubação preconizadas nos compêndios farmacopêicos.

A análise da TABELA 40/FIGURA 18 permitiu verificar a taxa de detecção dos microrganismos contaminantes nas diferentes temperaturas de incubação. Verificou-se que os microrganismos contaminantes apresentaram melhores taxas de detecção a temperaturas de incubação de 22°C e 32°C; mesmo microrganismos como *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pseudomonas aeruginosa*, que reconhecidamente se desenvolvem em temperaturas mais baixas, apresentaram boa evidência de crescimento quando incubados sob estas condições de temperatura.

A baixa eficiência de detecção em condições extremas de incubação pode ser decorrente tanto de peculiaridades metabólicas e exigências intrínsecas de cada espécie – como evidenciado para *Clostridium sporogenes* (2%), *Escherichia coli* (2%), *Micrococcus luteus* (16%) e *Staphylococcus aureus* (8%) quando incubados a 12°C e *Saccharomyces cerevisiae* (9%) quando incubado a 42°C (TABELA 40/FIGURA 18) – como por alterações na composição dos meios de cultura durante o período de incubação.

CARAZONE e FAVA ⁽³⁵⁾, verificaram o efeito do tempo entre a preparação e o uso de meios de cultura no crescimento de microrganismos aeróbios e anaeróbios. Segundo este estudo, o envelhecimento do meio de cultura exerce um efeito tóxico sobre o crescimento dos microrganismos devido a um processo de auto-oxidação, com formação de radicais peróxidos – a cisteína se auto-oxida produzindo radicais peróxidos tanto mais facilmente quanto maior for a quantidade de glicose e fosfato no meio de cultura, que danificariam a parede e a membrana celulares e a função transportadora de nutrientes para o interior das células – e a evaporação, que concentra os componentes da formulação.

BARZAGUI et al ⁽²⁰⁾ também verificaram que o envelhecimento dos meios de cultura acarreta alterações de suas características de fertilidade.

Constatou-se que à temperatura de 42°C, ocorreu alteração no volume dos meios de cultura, decorrente de evaporação, que pode ter causado alteração na composição dos meios a ponto de impedir ou dificultar o desenvolvimento de microrganismos. Verificou-se também que a esta temperatura de incubação, o meio Clausen apresentou alteração de suas características após três ou quatro dias de incubação, perdendo sua capacidade em promover o crescimento de microrganismos (FIGURA 39). De forma semelhante, embora em menor extensão, o meio de tioglicolato apresentou alteração de características após 15 a 16 dias de incubação a 42°C. A constatação da perda da capacidade de promover o crescimento foi obtida através da inoculação de volume adequado do inóculo para obtenção de nível de contaminação de 10 UFC a tubos contendo de meio Clausen mantidos por 4 dias sob temperatura de 42°C.

FIGURA 39 – Alterações observadas no meio de cultura Clausen após 4 dias de incubação sob temperatura de 42°C.

A TABELA 43/FIGURA 19 mostra os resultados do tempo necessário para verificar o crescimento dos vários microrganismos contaminantes. Verificou-se que o tempo necessário para detecção de bactérias é, no geral, menor que para a detecção de fungos, exceto no caso de *Micrococcus*

luteus, que apresentou uma média de tempo maior para ter seu crescimento visualizado (8 dias e 3 horas).

Da análise das TABELAS 31 e 43, confirma-se a adequação do uso de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* como cepas padrão para testes de avaliação da capacidade promotora do crescimento de meios de cultura. A taxa de recuperação de *Staphylococcus aureus* (47%) apresentou pouca diferença da obtida com *Micrococcus luteus* (43%), no entanto o tempo médio para a visualização do crescimento de *Staphylococcus aureus* foi menor que para *Micrococcus luteus* (4 dias 14 h e 8 dias 3 h, respectivamente). No caso dos fungos, *Candida albicans* apresentou maior taxa de recuperação que *Saccharomyces cerevisiae* (66% e 49%, respectivamente) embora o tempo médio para a visualização do crescimento não apresentou diferença significativa (5 dias 23 h e 6 dias e 6 h, respectivamente).

CAPUTO, ROHN e MASCOLI ⁽³³⁾ verificaram que a taxa de recuperação de indicadores biológicos submetidos a tratamentos em doses subletais depende das condições de tempo e temperatura de incubação, sendo que a temperaturas de incubação maiores a taxa de recuperação foi mais alta.

A TABELA 44/FIGURA 20 mostra os resultados de tempo necessário para evidenciar o crescimento dos contaminantes em diferentes temperaturas. Verificou-se o efeito da temperatura sobre o nível de crescimento microbiano, sendo que, conforme esperado, o aumento da temperatura permitiu a detecção mais rápida dos contaminantes.

Da análise da TABELA 48/FIGURA 24, que mostra o tempo médio necessário para a detecção dos contaminantes em diferentes temperaturas de acordo com a metodologia de inoculação empregada, e da TABELA 49/FIGURA 25, que mostra o tempo médio necessário para a evidenciar o

crescimento dos microrganismos em cada um níveis de contaminação empregados em diferentes temperaturas de incubação, verificou-se que o aumento da temperatura permitiu detecção dos contaminantes em tempos médios menores.

Como anteriormente mencionado, a temperatura influencia o desenvolvimento microbiano, sendo característica de cada microrganismo o grau de influência. A TABELA 50/FIGURA 26 mostra o tempo médio de incubação necessário para a detecção dos diferentes microrganismos contaminantes em cada uma das temperaturas de incubação utilizadas. Tratando-se de microrganismos mesófilos, o aumento da temperatura de incubação permitiu detectar os contaminantes em tempos médios menores.

Além da temperatura de incubação, o tipo de meio de cultura utilizado influenciou o tempo médio necessário à detecção do crescimento microbiano. A TABELA 45/FIGURA 21 mostra o tempo médio necessário para a detecção da contaminação em cada um dos tipos de meios de cultura empregados. Verificou-se que, em geral, o meio de tioglicolato permitiu detecção em tempos médios menores em relação aos demais meios de cultura empregados.

Da análise das TABELAS 32 e 45, confirmou-se a adequação do meio de tioglicolato e do meio de caseína de soja em testes de esterilidade uma vez que estes meios de cultura apresentaram maior eficiência na detecção dos microrganismos contaminantes (55% e 60%, respectivamente) em tempos médios menores (4 dias e 16 h e 5 dias e 4 h, respectivamente).

A TABELA 51/FIGURA 27 mostra o tempo médio necessário para a detecção dos diferentes níveis de contaminação em cada um dos meios de cultura utilizados. Verificou-se que o meio de tioglicolato permitiu detecção mais rápida dos diferentes níveis de contaminação em relação aos demais meios de cultura empregados.

A TABELA 53/FIGURA 29 evidencia o tempo médio necessário para a visualização dos diferentes microrganismos contaminantes em cada um dos meios de cultura utilizados.

No caso das bactérias, verificaram-se poucas diferenças no tempo necessário para visualização de crescimento, quando utilizados sob condições comparáveis, os meios de cultura de caseína de soja, tioglicolato e Clausen.

No caso dos fungos, verificaram-se poucas diferenças no tempo médio necessário para visualização do crescimento quando se utilizaram os meios de cultura Sabouraud e caseína de soja, confirmando a adequação deste na detecção tanto de bactérias como de fungos.

A análise desenvolvida permite verificar ainda que, embora não existam diferenças significativas na eficiência de detecção de *Bacillus subtilis* entre o meio Clausen (26%) e o meio tioglicolato (27%) (TABELA 39/FIGURA 17), verificam-se diferenças no tempo médio necessário para detectar crescimento, sendo mais rápida em meio Clausen (3 dias e 23 horas) do que em meio de tioglicolato (4 dias e 18 horas) (TABELA 53/FIGURA 29). No caso de *Clostridium sporogenes*, não houve diferença significativa na eficiência de detecção entre o meio Clausen (48%) e o meio de tioglicolato (47%), nem no tempo médio necessário para visualização da contaminação (4 dias e 23 h e 4 dias e 16 h, respectivamente)

A TABELA 52/FIGURA 28 mostra o tempo médio para detecção dos contaminantes nos diferentes meios de cultura empregados de acordo com a temperatura de incubação utilizada. Verificou-se que o aumento da temperatura de incubação permitiu a detecção mais rápida dos contaminantes em todos os meios de cultura empregados.

Conforme anteriormente citado, constatou-se que à temperatura de 42°C, ocorreram alterações nas características do meio Clausen, após 3 a 4 dias incubação, fazendo com que este meio de cultura perdesse a capacidade de promover o crescimento dos microrganismos contaminantes. A análise da TABELA 63/FIGURA 39, que mostra a diferença na detecção de contaminantes de acordo com os tipos de meios de cultura e condições de temperaturas de incubação empregados, evidencia que à temperaturas de incubação de 42°C, o meio Clausen permitiu a evidência de contaminação nos 7 primeiros dias de incubação.

A análise da TABELA 46/FIGURA 22, que mostra o tempo médio necessário para a visualização dos diferentes níveis de contaminação, demonstrou que o aumento do nível de contaminação ocasionou uma detecção dos contaminantes em tempos médios menores (5 dias e 14h, 5 dias e 6 h e 5 dias e 1 h para os níveis de contaminação de 05, 10 e 50 UFC/unidade, respectivamente).

A TABELA 54/FIGURA 30, que mostra o tempo médio necessário para a visualização do crescimento de cada um dos microrganismos contaminantes de acordo com o nível de contaminação, evidenciou que de modo geral o aumento do nível de contaminação permitiu uma detecção mais rápida dos contaminantes.

Da análise da TABELA 55/FIGURA 31 verificou-se que, em geral, não houveram diferenças significativas entre os métodos de inoculação no tempo necessário para a detecção dos diversos microrganismos contaminantes, exceto para a detecção de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Outra interação significativa ocorreu entre meios de cultura e métodos de inoculação empregados, no que diz respeito ao tempo médio necessário para evidenciar contaminação (TABELA 56/FIGURA 32). Da análise das

TABELAS 45 e 53, verificou-se que, em geral, o meio de tioglicolato permitiu detecção de contaminação em tempos médios menores, o que poderia explicar a interação demonstrada na TABELA 56.

A análise da TABELA 47/FIGURA 23, que mostra os resultados obtidos nos tempos médios necessários para a detecção de contaminantes pelos diferentes métodos de inoculação, evidenciou diferenças significativas entre os métodos de inoculação empregados, sendo que o método empregando inoculação indireta nos moldes convencionais permitiu verificar crescimento microbiano em tempo médio menor (4 dias e 21 horas) que nos demais métodos (5 dias e 9 horas e 5 dias e 11 horas, para o método direto e método indireto em sistema fechado, respectivamente).

Da análise da TABELA 57/FIGURA 33, que mostra os tempos médios necessários para a detecção dos diferentes níveis de contaminação de acordo com o método de inoculação empregado, verificou-se que, no geral, o aumento da contaminação permitiu a detecção em tempos médios menores em todos os métodos de inoculação empregados. Verificou-se, ainda, que o método indireto convencional permitiu detecção mais rápida em relação aos demais métodos de inoculação, exceto para a detecção de nível de contaminação menor (05 UFC), que foi mais rapidamente detectado pelo método direto.

No entanto, as TABELA 47 e TABELA 57 mostram as médias do tempo de incubação necessário para a detecção da contaminação. A análise da TABELA 59/FIGURA 35, que mostra a porcentagem de evidência de contaminação de cada método de inoculação empregado de acordo com o tempo de incubação, e da TABELA 60/FIGURA 36, que mostra a porcentagem de evidência de contaminação de cada método de inoculação empregado para verificar diferentes níveis de contaminação de acordo com o tempo de incubação, evidencia não haver diferenças significativas entre os

métodos de inoculação empregados no que se refere ao período de incubação necessário para detecção do crescimento microbiano.

BATHGATE, LAZZARI, CAMERON e McKAY ⁽²¹⁾, assim como COOPER ⁽³⁹⁾, verificaram que não existem diferenças significativas entre os métodos de esterilidade quanto ao período de incubação necessário para detecção de contaminantes e sugerem que o período de incubação de 14 dias, independente do método de teste empregado, permite maior taxa de recuperação de contaminantes. Por outro lado, WILSON e VARNEY ⁽¹¹³⁾ apontam que o aumento do tempo de incubação exerce pouca influência sobre a sensibilidade do teste de esterilidade.

A análise da TABELA 58/FIGURA 34, que mostra a porcentagem de evidência de contaminação de acordo com o tempo de incubação, indica que 81% das amostras evidenciaram crescimento microbiano nos primeiros 7 dias de incubação, 13% das amostras evidenciaram crescimento microbiano entre 8 e 14 dias de incubação e apenas 6%, após 15 dias de incubação.

A análise da TABELA 61/FIGURA 37, que mostra a porcentagem de evidência da contaminação de acordo com a temperatura de incubação empregada, evidencia que a incubação a temperaturas mais baixas exige um período de incubação maior para a detecção da contaminação. Tal evidência permite explicar a taxa de 6% de evidência de contaminação após 15 dias de incubação, observada na TABELA 58.

Alguns compêndios oficiais, como a Farmacopéia Brasileira ⁽⁴⁸⁾, utilizam períodos de incubação diferenciados de acordo com o método de inoculação empregado, sendo que para o método direto preconizam um período de incubação de 14 dias, enquanto que para o método indireto, um período de 7 dias. BATHGATE, LAZZARI, CAMERON e McKAY ⁽²¹⁾, assim como COOPER ⁽³⁹⁾, conforme anteriormente citado, sugerem a utilização de um período de incubação de 14 dias, independente do método de teste

empregado, como forma de obter maior taxa de recuperação de contaminantes.

A análise da TABELA 59/FIGURA 35, que mostra a porcentagem de evidência de contaminação de cada método de teste empregado de acordo com o período de incubação necessário para a visualização da contaminação, indica que se utilizado um período de incubação de 7 dias, a taxa de evidência de contaminação dos métodos indireto convencional e indireto em sistema fechado seria de 83% e 80%, respectivamente. No entanto, se utilizado um período de incubação de 14 dias, a taxa de evidência de contaminação passaria a 95% e 94%, para os métodos indireto convencional e indireto em sistema fechado, respectivamente, enquanto que para o método direto a taxa de evidência de contaminação em 14 dias de incubação é de 92%.

A análise da TABELA 62/FIGURA 38, que mostra a porcentagem de evidência da contaminação de cada método de inoculação de acordo com a temperatura de incubação empregada, evidencia que a incubação a temperaturas mais baixas exige um período de incubação maior para a detecção da contaminação em todos os métodos aplicados, explicando as taxas de evidência de contaminação observadas entre 15 e 28 dias de incubação observadas na TABELA 59.

MACKAY e DERRICK ⁽⁷²⁾ estudaram a duração da fase “lag” de *Salmonella typhimurium* submetidas a processos de injúria e verificaram que sua extensão depende do tipo de injúria a que o microrganismo foi submetido e do grau de severidade da mesma. De modo geral, quanto maior a extensão do dano, maior é o tempo necessário para a recuperação dos microrganismos.

Os resultados obtidos no estudo indicaram que os tempos médios para visualização do crescimento dos contaminantes estiveram de acordo

com o período de incubação recomendado nas principais farmacopéias (28,46,48,65,106). No entanto, é preciso considerar que os microrganismos contaminantes encontram, no produto farmacêutico, condições adversas e muitas vezes mantêm sua viabilidade sob a forma esporulada, portanto, o período de incubação deve levar em consideração o tempo para que estes contaminantes se recuperem e se multipliquem a níveis detectáveis.

8. CONCLUSÕES

- 1- Os três métodos de teste de esterilidade – empregando inoculação direta, inoculação indireta nos moldes convencionais e inoculação indireta em sistema fechado (Steritest[®]) – apresentaram diferenças na eficiência na detecção de contaminantes, mesmo quando observadas as mesmas condições quanto ao número de unidades testadas e à quantidade de cada unidade submetida ao teste.
- 2- Os meios de cultura – meio de caseína de soja e meio de tioglicolato – bem como as condições de temperatura de incubação – 22°C e 32°C – preconizados nas diversas farmacopéias, apresentaram os melhores resultados na detecção de microrganismos contaminantes.
- 3- O tempo de incubação de 14 dias, conforme preconizado nos compêndios farmacopêicos, mostrou-se suficiente para a detecção de microrganismos contaminantes.
- 4- As cepas microbianas preconizadas nas diversas farmacopéias para verificar a capacidade promotora do crescimento de meios de cultura mostraram-se adequadas para a finalidade de uso.
- 5- Pode-se inferir quanto à adequação da metodologia atualmente adotada para o teste de esterilidade, merecendo apenas, na Farmacopéia Brasileira, que se estenda o tempo de incubação para 14 dias, independente do método de inoculação aplicado.
- 6- O teste de esterilidade, desde que devidamente validado e executado, constitui-se em uma ferramenta efetiva para a segurança no consumo de produtos estéreis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDOU, M. A. F. Comparative Study of Seven Media for Sterility Testing. Journal of Pharmaceutical Sciences, Washington, v. 63, n. 1, p. 23-26, 1974.
2. AGALLOCO, J. Validation: An Unconventional Review and Reinvention. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 49, n. 4, p. 175-179, 1995.
3. AKERS, M. J. ; WRIGHT, G. E. ; CARLSON, K. A. Sterility Testing of Antimicrobial-Containing Injectable Solutions Prepared in the Pharmacy. American Journal of Hospital Pharmacy, Washington, v. 48, n. 11, p. 2414-2418, 1991.
4. AKERS, J. Simplifying and Improving Process Validation. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 47, n. 6, p. 281-284, 1993.
5. AKERS, J. E. Environmental Monitoring and Control: Proposed Standards, Current Practices, and Future Directions. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 51, n. 1, p. 36-47, 1997.

De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1994.

6. AKERS, J. ; AGALLOCCO, J. Sterility and Sterility Assurance. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 51, n. 2, p. 72-77, 1997.
7. ANISFELD, M. H. Validation – How Much Can the World Afford? Are We Getting Value for Money?. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 48, n. 1, p. 45-51, 1994.
8. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL. Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation, 1999. [Online]
9. APOSTOLO, E. ; LANZAROTTI, E. ; ZAIA, P. Considerazioni sull'Impiego di Membrane Filtranti nel Test di Sterilità. Il Farmaco. Edizione Prática, Pavia, v. 28, n. 2, p. 115-124, 1973.
10. APOSTOLO, E. Advances in Sterility Testing. Il Farmaco. Edizione Prática, Pavia, v. 28, n. 8, p. 435-440, 1973.
11. ATHAYDE, A. Higienização de Áreas Limpas Deve Respeitar Padrões de Classificação. Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, São Paulo, v. 9, p. 24-27, 1999.
12. ATHAYDE, A. Vestimenta Adequada Contribui para Redução da Contaminação. Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, São Paulo, v. 10, p. 12-14, 1999.

13. AVALLONE, H. L. Control Aspects of Aseptically Produced Products. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 39, n. 2, p. 75-79, 1985.
14. AVALLONE, H. L. Sterility Retesting. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 40, n. 2, p. 56-57, 1986.
15. AVALLONE, H. L. Laboratory Controls – an FDA Investigator's Viewpoint. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 40, n. 5, p. 178-181, 1986.
16. AVALLONE, H. Current Regulatory Issues Regarding Parenteral Inspections. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 43, n. 1, p. 3-7, 1989.
17. AVALLONE, H. L. Aseptic Processing of Non-Preserved Parenterals. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 43, n. 3, p. 113-114, 1989.
18. BARBOSA, H. R. ; TORRES, B. B. Microbiologia Básica. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. 196 p.
19. BARRICHELLO, A. Teste de Esterilidade e Liberação Paramétrica. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, São Paulo, v. 33, supl. 1, p. 33-39, 1997.

20. BARZAGHI, D. ; BELLA, G. ; BIANCO, L. ; BONOMI, E. ; CAFIERO, M. ; CARAZZONE, M. ; GENOVA, R. ; NERI, G. ; BIZZARRI, D. ; TAGLIAPIETRA, L.; VERONESE, M. Saggio di Sterilità – Controllo di Fertlità Del Terreno Colturale al Tioglicolato per i Microorganismi Anaerobi. Bollettino Chimico Farmacêutico, Milano, v. 119, p. 229-237, 1980.
21. BATHGATE, H. ; LAZZARI, D. ; CAMERON, H. ; MCKAY, D. The Incubation Period in Sterility Testing. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 47, n. 5, p. 254-257, 1993.
22. BEAUPIN, C. M. ; LIEBSCHUTZ, S. ; BENSADOUN, J. Bacteriologic survey of a Cleanroom. American Society of Health System Pharmacists, Washington, v. 52, n. 11, p. 2469-2470, 1995.
23. BEER, C. L. Gowning Training: The Use of Video Recording Together with Microbial Assessment. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 45, n. 3, p. 128-131, 1991.
24. BONATO, R. A. Introdução a Tecnologia de Salas Limpas: Operação e Gerenciamento. In: SEMINÁRIO: NOVOS RUMOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA, São Paulo, UNIFAR, 1997. 20 p.

25. BOWMAN, F. W. The Sterility Testing of Pharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical Sciences, Washington, v. 58, n. 11, p. 1301-1307, 1969.
26. BOWMAN, F. W. ; WHITE, M. ; CALHOUN, M. P. Collaborative Study of Aerobic Media for Sterility Testing by Membrane Filtration. Journal of Pharmaceutical Sciences, Washington, v. 60, n. 7, p. 1087-1088, 1971.
27. BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria n. 500, de 9 de outubro de 1997. Diário Oficial da União, Brasília, n. 197, 13 de outubro de 1997. Seção I, p. 22996-23027. [A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde estabelece regulamento técnico sobre Soluções Parenterais de Grande Volume – SPVG].
28. BRITISH PHARMACOPOEIA, London, Her Majesty's Stationery Office, 1993. Volume II, Appendix XVIA, A180-A184.
29. BROWN, M. R. ; GILBERT, P. Increasing the Probability of Sterility of Medicinal Products. Journal of Pharmacy and Pharmacology, London, v. 29, n.9, p. 517-523, 1977.
30. BUCHANAN, E. C.; SCHNEIDER, P. J.; SWITZKY, H. ; TRISSEL, L. A. Draft Guidelines on Quality Assurance for Pharmacy Prepared Sterile Products. American Journal of Hospital Pharmacy, Washington, v. 49, p. 407-417, 1992.

31. BUOGO, A.; GUERRATO, G. ; GIULIONI, A. ; PAPAKRISTO, G. Aspetti Microbiologici Dell'Ambiente Farmaceutico. Bollettino Chimico Farmaceutico, Milano, v. 118, n. 1, p. 9-17, 1979.
32. BUOGO, A. ; DE PARRI, G. C. ; ZANUSO, G. ; MECARELLI, E. Suitability of *Micrococcus luteus* and *Saccharomyces cerevisiae* for Testing the Fertility of Media Used in Drug Sterility Assays. Bollettino Chimico Farmaceutico, Milano, v. 119, n. 6, p. 361-370, 1980.
33. CAPUTO, R. A. ; ROHN, K. J. ; MASCOLI, C. C. Recovery of Biological Indicator Organisms after Sublethal Sterilization Treatment. Journal of the Parenteral Drug Association, Washington, v. 34, n. 5, p. 394-397, 1980.
34. CARAZZONE, M. e FAVA, M. Saggio di Sterilità: Proposta di un Sistema Automático di Campionamento e Filtrazione in Sistema Chiuso. Bollettino Chimico Farmacêutico, Milano, v. 121, n. 2, p. 71-79, 1982.
35. CARAZZONE, M. ; FAVA, M. Saggio di Sterilità: Considerazioni sulla Fertilità dei Mezzi Colturali. Bollettino Chimico Farmacêutico, Milano, v. 121, n. 2, p. 257-275, 1982.
36. CHEVALIER, F. Process Parametric Release – The Canadian Regulatory View. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 39, n. 5, p. 190-193, 1985.

37. CLAUSEN, O. G. A Study of the Growth-promoting Properties of Fluid and Solid Microbial-Contamination Test Media on Small Numbers of Microorganisms. Pharmaceutica Acta Helvetiae, Zurich, v. 48, p. 541-548, 1973.
38. COOPER, M. S. The Evolving USP Sterility Test. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 36, n. 6, p. 256-259, 1982.
39. COOPER, M. S. Sterility Test Incubation Issue [letter]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 50, n. 1, p. 2, 1996.
40. CYTRYNBAUM, H.M. Pessoal: O Principal Fator em Operações de Salas Limpas. Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, São Paulo, v. 10, p. 19-24, 1999.
41. DART, R. K. Microbiology for the Analytical Chemist. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996. 149p.
42. DENNY, V. F. ; MARSIK, F. J. Current Practices in the Use of Disinfectants Within the Pharmaceutical Industry. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 51, n.6. p. 227-228, 1997.
43. DIXON, A. M. Training Cleanroom Personnel. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 45, n. 6, p. 276-279, 1991.
44. ERNST, R. R. In: LAWRENCE, C. A. ; BLOCK, S. S. Disinfection, Sterilization and Preservation. Philadelphia: Lea &Febiger, 1968. p.703-740.

45. EUDAILEY, W. A. Membrane Filters and Membrane-filtration Processes for Health Care. American Journal of Hospital Pharmacy, Washington, v. 40, n. 11, p. 1921-1923, 1983.
46. EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 3. ed. Paris, Council of Europe. 1997. p. 73-77, 283-285.
47. EZELL, J. R. ; GODWIN, H. N. ; HASSANEIN, R. N. ; MATCHETT, J. A. Comparison of Videocassette and Personal Instruction Methods for Training Pharmacy Personnel in Aseptic Technique. American Journal of Hospital Pharmacy, Washington, v. 45, n. 10, p. 2112-2116, 1988.
48. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I. p. V.5.1.1-V.5.1.1.-6.
49. FRIEBEN, W. R. Control of the Aseptic Processing Environment. American Journal of Hospital Pharmacy, Washington, v. 40, n. 11, p. 1928-1935, 1983.
50. FRIEBEN, W. R. ; ENZINGER, R. M. Sterile Product Manufacturing Technology. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 46, n. 3, p. 85-86, 1992.
51. FRY, E. FDA Update on Aseptic Processing Guidelines. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 41, n. 2, p. 56-60, 1987.
52. FRY, E. M. PDA Comments to USP on 'Proposed Changes to <71> Sterility Tests'. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 50, n. 2, p. 69-78, 1996.

53. GEE, L. W. ; HARVEY, J. M. G. H. ; OLSON, W. P. ; LEE, M. L. Sterility Test Systems for Product Recovery. Journal of Pharmaceutical Sciences, Washington, v. 74, n. 1, p. 29-32, 1985.
54. GOLD, D. H. Validation: Why, What, When, How Much. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 50, n. 1, p. 55-60, 1996.
55. GONZALEZ, M. M.; MARIA, H. R. J. ; OLGA, P. T. ; CARDOSO, T. A. O. Desenho de um Método para a Seleção de Pontos de Amostragem no Controle Ambiental de Áreas Limpas. Revista Brasileira de Farmácia, São Paulo, v. 79, n. 1/2, p. 11-14, 1998.
56. GRIMME, R. ; KÖLBLIN, R. ; SCHÜLE, A. ; TRICK, I. Detecção de Contaminação Biológica. Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, São Paulo, v. 9, p. 28-31, 1999.
57. GUILFOYLE, D. E. ; YAGER, J. F. Procedures Used for Sterility Testing of Parenteral Drugs by an FDA Field Laboratory. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 138-141, 1984.
58. GUYNN, J. B. ; PORETZ, D. M ; DUMA, R. J. Growth of Various Bacteria in a Variety of Intravenous Fluids. American Journal of Hospital Pharmacy, Washington, v. 30, n. 4, p. 321-325, 1973.
59. HILL, D. ; BEATRICE, M. Facility Requirements for Biotech Plants. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 45, n. 3, p. 132-137, 1991.

60. HUIKAMP, H. Controle de Contaminação com Relação à Qualificação CE de Artigos Médicos. Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, São Paulo, v. 10, p. 33-37, 1999.
61. HYDE, W.A. Origin of Bacteria in the Clean Room and Their Growth Requirements. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 52, n. 4, p. 154-158, 1998.
62. INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION. Sterility Assurance Based on Validation of the Sterilization Process Using Steam Under Pressure. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 43, n. 5, p. 226-230, 1989.
63. INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION. Validation and Environmental Monitoring of Aseptic Processing. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 44, n. 5, p. 272-277, 1990.
64. INTERNATIONAL PHARMACEUTICAL FEDERATION. Validation and Control of Non-Standard Sterilization Processes. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 47, n. 1, p. 9-15, 1993.
65. JAPANESE PHARMACOPOEIA. 13. ed. Tokyo, The Society of Japanese Pharmacopoeia, 1996.
66. JONES, R. Áreas Limpas: Conceitos, Limpeza, Manutenção e Certificação. Revista Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, São Paulo, v. 33, supl. 1, p. 27-32, 1997.

67. KRÜGER, D. Kontrolle der Biokontamination zur Überwachung von Reinraumanlagen aus Pharmazeutischer Sicht. Pharm. Ind., Aulendorf, v. 46, n. 6, p. 646-650, 1984.
68. KRUSE, R. H. ; PUCKETT, W. H.; RICHARDSON, J. H. Biological safety Cabinetry. Clinical Microbiology Reviews, v. 4, n. 2, p. 207-241, 1991.
69. LIEBERMAN, A. ; SHEPHERD, C. Procedimentos de Contagem de Partículas para Monitoração de Salas Limpas. Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, São Paulo, v. 9, p. 14-20, 1999.
70. LJUNGQVIST, B. ; REINMÜLLER, B. Interaction Between Air Moviments and the Dispersion of Contamination: Clean Zones with Unidirectional Air Flow. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 47, n. 2, p. 60-69, 1993.
71. LUMINI, E. Flusso D'Aria Laminare: Applicazione ai Locali Sterili. Bollettino Chimico Farmacêutico, Milano, v. 114, n. 7, p. 361-374, 1975.
72. MACKEY, B. M. ; DERRICK, C. M. Conductance measurements of the lag phase of injured *Salmonella typhimurium*. Journal of Applied Bacteriology, v. 57, p. 299-208, 1984.
73. MACKLER, S. E. Modular facilities delivery. Environmental Science and Technology, Washington, p. 332-339, 1998.

74. MARSHALL, V. ; POULSON-COOK, S. ; MOLDENHAUER, J.
Comparative Mold and Yeast Recovery Analysis (The Effect of
Differing Incubation Temperature Ranges and Growth Media).
PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology,
Bethesda, v. 52, n. 4, p. 165-169, 1998.
75. MAYHALL, C. G.; PLERPAOLL, P. G.; HALL, G. O. ; THOMAS, R.
B. Evaluation of a Device for Monitoring Sterility of Injectable
Fluids. American Journal of Hospital Pharmacy, Washington, v.
38, n. 8, p. 1148-1150, 1981.
76. MENDES, I. F. ; PRAL, E. M. F. ; TAKATA, C. S. ; RIZZO, E. ;
SAITO, T. Estudo Comparativo de Meios de Cultura
Recomendados para Testes de Esterilidade de Produtos
Biológicos. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, São Paulo, v.
21, n. 1, p. 62-70, 1985.
77. MURRAY, K. M. ; MURRI, N. ; SCHUMANN, L. ; IVEY, M. F.
Bacterial and Fungal Growth after Freezing or Refrigerating
Parenteral Nutrient Solutions. American Journal of Hospital
Pharmacy, Washington, v. 44, n. 1, p. 121-124, 1987.
78. NEGRETTI, F. ; CASETTA, P. Research on Sterility and
Contamination Controls of Chemotherapeutic Agents by
Membrane Filtration Method. Journal of Pharmaceutical and
Biomedical Analysis, London, v. 9, n. 9, p. 773-776, 1991.
79. NEGRETTI, F. Il Controllo Microbiológico per Filtrazione su
Membrana dei Medicinali Dotati di Proprietà Antimicrobiche:
Problemi – Proposte – Prospettive. Bollettino Chimico
Farmaceutico, Milano, v. 136, n. 1, p. 28-38, 1997.

80. ODLAUG, T. E. ; OCWIEJA, D. A. ; PUROHIT, K. S. ; RILEY, R. M.; YOUNG, W. E. Sterility Assurance for terminally Sterilized Products Without End-Product Sterility Testing. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 141-147, 1984.
81. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Normas Y Recomendaciones para Sustancias Biologicas n. 6, Ginebra, p. 43-67, 1973.
82. OSUMI, M. ; YAMADA, N. ; TOYA, M. Bacterial Retention Mechanisms of Membrane Filters. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 50, n. 1, p. 30-34, 1996.
83. PDA ENVIRONMENTAL TASK FORCE. Fundamentals of a Microbiological Environmental Monitoring Program. Technical Report n 13. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 44, suppl, p. S3-S16, 1990.
84. PARENTERAL DRUGS ASSOCIATION. PDA Comments on USP In-Process Revision <1116> Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Enviroments. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 264-266, 1995.
85. PARENTERAL DRUGS ASSOCIATION. PDA Comments: USP on Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Enviroments <1116>. PDA Journal of Pharmaceutcal Science and Technology, Bethesda, v. 51, n. 6, p. 222-226, 1997.

86. PARENTERAL DRUGS ASSOCIATION. PDA Technical Report n. 30: Parametric Release of Pharmaceuticals Terminally Sterilized by Moist Heat. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 53, n. 4, p. 217-222, 1999.
87. PHARMACEUTICAL INSPECTION CONVENTION. Draft Recommendation on Sterility Testing. 22/03/1999. [Online]
88. PENG, F. ; TU, G. Estudo de Salas Limpas com Fluxo Unidirecional Local. Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação, São Paulo, v. 10, p. 29-32, 1999.
89. PONGILUPPI, S. Aspetti Microbiologici Della Produzione Farmaceutica Sterile. Considerazioni ed Esperienze. Bollettino Chimico Farmaceutico, Milano, v. 124, n. 7, p. 293-305, 1985.
90. RIBEIRO, M. C. ; SOARES, M. M. S. R. Microbiologia Prática. Roteiro e Manual. Bactérias e Fungos. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. 112 p.
91. SETNIKAR, I. Accertamento della Sterilità. Bollettino Chimico Farmaceutico, Milano, v. 114, n. 5, p. 241-250, 1975.
92. SEYFARTH, H. Examination of Pharmaceutical Preparations for Sterility According to the Regulations of the USP XX and the Ph. Eur. (Supplement 1980). Drugs Made in Germany, v. 26, n. 1, p. 21-29, 1983.
93. SHARP, J. Aseptic Validation of a Form/Fill/Seal Installation: Principles and Practice. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 44, n. 5, p. 289-292, 1990.

94. SHARP, J. Validation – How Much is Required? PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 49, n. 3, p. 111-118, 1995.
95. SILVEIRA, S. R. Sistema de Tratamento do Ar. Certificação e Qualificação. In: SEMINÁRIO: NOVOS RUMOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA, São Paulo, UNIFAR, 1997. 22 p.
96. STAINES, L. Design Control and Validation of a Facility for Sterile Clinical Trial Preparations. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 38, n. 3, p. 109-114, 1984.
97. TETZLAFF, R. F. Investigational Trends: Clean Room Environmental Monitoring. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 46, n. 6, p. 206-214, 1992.
98. TRABULSI, L. R. Microbiologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1991.
99. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 11. ed. Easton, Mack Printing Company, 1936. p.469.
100. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 12. ed. Easton, Mack Printing Company, 1942. p. 609-614.
101. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 13. ed. Easton, Mack Printing Company, 1947. p. 689-692.
102. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 14. ed. Easton, Mack Printing Company, 1950. p. 758-762.

103. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 18. ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 1970. p. 851-857.
104. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 22. ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 1990. p. 1483-1488.
105. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 23. ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 1995. p. 1686-1690, 1982-1984.
106. UNITED STATES PHARMACOPEIA. 24. ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 2000. p. 1818-1823, 2099-2106.
107. VAN DOORNE, H. ; VAN KAMPEN, B. J ; VAN DER LEE, R. W. ; RUMMENIE, L.; VAN DER VEEN, A. J. e DE VRIES, W. J. Industrial Manufacture of Parenteral Products in the Netherlands. A Survey of Eight Years of Media Fills and Sterility Testing. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 52, n. 4, p. 159-164, 1998.
108. WALLHÄUBER, K. H. Sterility Assurance Based on Validation and In-process Control for Microbial Removal Filtration and Aseptic Filling. Pharm. Ind., Aulendorf, v. 47, n. 3, p. 314-319, 1985.
109. WHYTE, W. The Influence of Clean Room Design on Product Contamination. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 38, n. 3, p. 103-108, 1984.

110. WHYTE, W. Sterility Assurance and Models for Assessing Airborne Bacterial Contamination. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 40, n. 5, p. 188-197, 1986.
111. WHYTE, W. ; NIVEN, L. Airborne Bacteria Sampling: The Effect of Dehydration and Sampling Time. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 40, n. 5, p. 182-187, 1986.
112. WHITE, W. ; NIVEN, L. ; BELL, N. D. S. Microbial Growth in Small-Volume Pharmaceuticals. Journal of Parenteral Science and Technology, Philadelphia, v. 43, n. 5, p. 208-212, 1989.
113. WILSON, J. D. ; VARNEY, M. Sterility Test Incubation Issue. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Bethesda, v. 49, n. 4, p. 157-159, 1995.

10. SUMÁRIO

Este trabalho consiste em um estudo sobre os parâmetros para validação de metodologia para teste de esterilidade. As qualificações das instalações e dos operadores são consideradas etapas integrantes na validação analítica, cuja finalidade abrange minimizar a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos. Foram comparadas as eficiências de três métodos de teste de esterilidade – empregando inoculação direta, inoculação indireta nos moldes convencionais e inoculação indireta em sistema fechado – quanto à detecção do crescimento de diferentes tipos de microrganismos normalmente encontrados como contaminantes em produtos farmacêuticos – *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococcus aureus*. Cada um deles foi inoculado em amostras constituídas de frascos plásticos de 10 mL de solução fisiológica em três diferentes níveis de contaminação: 5, 10 e 50 UFC/10 mL. Utilizou-se nos testes diferentes tipos de meios de cultura – meio de caseína de soja, meio de tioglicolato, meio Sabouraud e meio Clausen – bem como distintas temperaturas de incubação – 12, 22, 32 e 42 °C – durante um período de incubação de 28 dias. Os resultados demonstraram que as metodologias aplicadas apresentam diferenças significativas na eficiência de detecção de contaminantes, mesmo quando atendidas condições de equivalência quanto ao número de amostras e volume unitário submetidos ao teste. Verificou-se que as condições preconizadas nos compêndios farmacopeicos quanto aos tipos de meio de cultura, meio de caseína de soja e meio de tioglicolato, as temperaturas de incubação, 22 e 32 °C, bem como o período de incubação de 14 dias, apresentaram os melhores resultados na detecção de contaminantes microbiológicos.

11. SUMMARY

This paper aims the study of parameters used for validation of methods for sterility tests. Installation and operators qualification are considered a step for analytical validation, in order to reduce the occurrence of false-positive and false-negative results. The efficiency of three methods for sterility tests – with direct, conventional indirect and closed system indirect inoculation (Steritest[®]) – was submitted to a comparative study concerning their capacity of growth detection of different types of microorganisms that are most frequently found as contaminants of pharmaceutical products – *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Staphylococcus aureus*. Each of them was inoculated in samples of plastic bottles of physiological solution (10 mL) in three different levels of contamination: 5, 10 and 50 CFU/10 mL. Different types of culture media were used – soybean casein, thioglycollate, Sabouraud and Clausen – as well as different temperatures of incubation – 12, 22, 32 and 42 °C – during an incubation period of 28 days. The results showed significant differences between the methodologies applied in what concerns the detection of contamination, even an equivalent number of samples and content of each unit submitted to test. The best results for microbial contaminants detection were obtained as described in pharmacopeias in what concerns the types of culture medium, soybean casein media and thioglycollate media, the temperatures of incubation, 22 and 32 °C, and the incubation period of 14 days.