

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

Validação de teste de esterilidade baseado em detecção de
dióxido de carbono

Rodolfo Santos de Lira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

L768v Lira, Rodolfo Santos de
Validação de teste de esterilidade baseado em detecção de dióxido de carbono / Rodolfo Santos de Lira. -- São Paulo, 2013. 84p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador : Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Medicamento : Controle de qualidade I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

615.19015 CDD

Rodolfo Santos de Lira

Validação de teste de esterilidade baseado em detecção de dióxido de carbono

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
orientadora/presidente

1o. examinador

2o. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço o seu amor eterno, pilar da minha existência.

À minha mãe Dilva Rosa Santos com amor, pelo constante empenho em minha educação, pela amizade, pelo apoio, por todos os ensinamentos e pelo exemplo a de vida a ser seguido.

À Marina de Queiroz Freire, com amor, por todo o apoio compreensão e carinho durante a elaboração desse trabalho.

À Profa. Tit. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto pela oportunidade de realização do curso de mestrado, orientação, apoio e incentivo constantes.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte material que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Instituto Adolfo Lutz, representado pela Dra. Adriana Bugno, pelo suporte e apoio na realização desse trabalho.

Aos funcionários do CONFAR (FCF-USP) pelo suporte e apoio na realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Controle Biológico de Qualidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo suporte e incentivo, particularmente ao Wesley Anderson de Oliveira.

À Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi pelo apoio e incentivo constantes.

À Biomerieux, pelo fornecimento do equipamento e suporte técnico-científico.

Ao Laboratório BAXTER pelo fornecimento dos produtos que foram utilizados nesse trabalho.

Aos amigos Felipe Menequini Branco; Nelson Sakurada e

Alexandre Tachibana Pinheiro pelo apoio e constante incentivo.

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

RESUMO

LIRA, R.S. **Validação de teste de esterilidade baseado em detecção de dióxido de carbono**. 84 p. f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

De acordo com compêndios farmacêuticos, o teste de esterilidade, requer período de incubação de 14 dias para obtenção de resultado analítico, período em que produto farmacêutico é mantido em quarentena, o que demanda custos elevados. Os métodos alternativos com aplicação na avaliação da esterilidade são particularmente interessantes, quando possibilitam a redução do período de incubação do teste, o período de quarentena e, em consequência, os custos envolvidos, além de reduzir o tempo para preparação do material requerido, para execução do ensaio e para a capacitação técnica. O presente estudo avaliou o desempenho do método microbiológico rápido BacT/Alert 3D (Biomérieux®) aplicado ao teste de esterilidade em comparação ao teste de esterilidade por método indireto descrito nas farmacopeias (brasileira, americana, européia e japonesa). O BacT/Alert 3D se baseia na detecção do crescimento microbiano, que é feita por meio de detecção de alteração da cor de um sensor sensível à liberação de dióxido de carbono produzido por metabolismo microbiano. Os testes utilizaram três diferentes soluções parenterais de grande volume: solução salina 0,9%, concentrado polieletrólítico para diálise e solução de metronidazol. Micro-organismos desafio: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Cargas de contaminação: 20, 2 e 0,2 UFC/membrana. Temperatura de incubação: $32,5 \pm 0,5$ °C. As amostras foram avaliadas por 14 dias. Amostras dos três produtos foram artificialmente contaminadas com BioBalls® SingleShot dos micro-organismos desafio de diferentes cargas de contaminação foram submetidas ao teste de esterilidade farmacopeico, com inoculação por método indireto. Após 18h de incubação, foram retiradas alíquotas de cada um dos meios de cultura, que foram inoculadas nos frascos de meio de cultura do BacT/Alert 3D. BacT/Alert 3D demonstrou equivalência ao método farmacopeico ($p > 0,05$) e tempo de detecção inferior.

Palavras-chave: Teste de esterilidade. Método microbiológico rápido.

ABSTRACT

LIRA, R.S. **Validation of sterility test based in carbon dioxide detection.** 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado) –Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Nowadays, the harmonized sterility test method described on pharmacopoeias requires an incubation period of 14 days. During this period the product stays on quarantine waiting the result for release, which demands warehousing and inventory costs. The application of Rapid microbiological methods for sterility testing is particularly interesting considering the benefits of incubation time reduction, quarantine period reduction, time reduction for material preparation, reduction of time for test execution and technical training. This work evaluated comparatively the performance of Bact/Alert 3D system as a rapid microbiological method applied to sterility testing and sterility testing according to described on Brazilian pharmacopeia and harmonized pharmacopoeias (American pharmacopeia, European pharmacopeia and Japanese pharmacopeia). The Bact/Alert 3D is based on microorganisms growth and has as principle the detection of pad color change which is sensible to carbon dioxide release by microorganism metabolism. To perform the evaluation it was considered Buffer saline solution, Metronidazol solution and Polieletrólito dialysis concentrate solution. Challenge Microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Inoculum load: 20CFU/sample; 2 CFU/sample; 0,2CFU/sample. Incubation temperature: $32,5 \pm 0,5$ °C. The samples were evaluated during 14 days. Aseptic samples of the three products were intentionally contaminated with BioBalls® SingleShot of challenge microorganisms, according to inoculum concentration desired, and were tested by indirect inoculation. After 18h aliquotes of were taken from inoculated culture media and inoculated into BacT/Alert 3D culture media bottles. Bact/Alert showed equivalence to compendial method ($p > 0,05$) and showed results faster than compendial method.

Keywords: Sterility test. Rapid microbiological method.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCTA - Bact/Alert® (Biomerieux)

CO₂ – Dióxido de Carbono

FDA – Food and Drug Administration

h – hora

IAL – Instituto Adolfo Lutz

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

LD – Limite de detecção

MFCP – Método Farmacopeico

mg – miligrama

min. – minuto

mL – mililitro

mm – milímetros

PDA – Parenteral Drug Association

PAT – Process Analytical Technology

pH – cologarítimo da concentração de íons de hidrogênio

RDC – Resolução da diretoria colegiada da agência nacional de vigilância sanitária

S – desvio padrão amostral

SPGV – Solução parenteral de grande volume.

SPS – Polianetol sulfato de sódio

UFC – unidades formadoras de colônia

t – tempo

Δ - delta

Δt – delta tempo

°C – grau Celcius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Química do Polianetol Sulfato de Sódio (SPS)	18
Figura 2 - Produção de íons hidrogênio na presença de CO ₂	20
Figura 3 - Frascos de meio de cultura de Bact/Alert® respectivamente em pH ácido e pH alcalino.....	20
Figura 4 - Mecanismo de detecção de alteração de pH nos frascos de meio de cultura de Bact/Alert®	21
Figura 5 - Algoritmos de detecção de crescimento microbiano em diferentes etapas	22
Figura 6 - Frasco contendo Bioball®.....	31
Figura 7 - Bact/Alert® com câmara de incubação aberta.....	34
Figura 8 - Escalpe para coleta de amostras à vácuo BD Vacutainer Brand Blood Collection sets® (Beckton Dickinson Company)	37
Figura 9 - Frasco SA®, utilizado no equipamento Bact/Alert®.....	39
Figura 10 - Frasco SN®, utilizado no equipamento Bact/Alert®.....	40
Figura 11 - Comparação de tempos de detecção médios segundo método de detecção.....	55
Figura 12 - Comparação de tempos de detecção médios segundo método de detecção e cepa microbiana.....	56
Figura 13 - Tempos de detecção médios no método Bact/Alert® segundo cepa microbiana e carga de contaminação.....	57
Figura 14 - Tempos de detecção médios no Método Farmacopeico segundo cepa microbiana e carga de contaminação.....	58
Figura 14 - Tempos de detecção médios no método Bact/Alert® segundo produto.	59
Figura 15 - Tempos de detecção médios no Método Farmacopeico segundo produto.	59
Figura 16 - Estatística descritiva do tempo de detecção no método Bact/Alert®.	60
Figura 17 - Estatística descritiva do tempo de detecção no Método Farmacopeico..	60
Figura 18 -Estatística descritiva do tempo de detecção no método Bact/Alert® sem resultados atípicos.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos micro-organismos testados.....	35
Tabela 2 - Número de réplicas utilizadas nas fases do experimento	42
Tabela 3 - Condições de incubação de cada cepa microbiana	44
Tabela 4 - Resultados da qualificação de operação (Prova de Conceito) – Carga de contaminação - 20UFC/teste.....	49
Tabela 5 - Resultados da qualificação de desempenho – Carga de contaminação - 2 UFC/teste	50
Tabela 6 - Resultados da Qualificação de desempenho – Carga de contaminação – 0,2 UFC/teste	51
Tabela 7 - Resultados de Monitoramento Ambiental.....	52
Tabela 8 - Resultados dos testes de associação entre os métodos nos experimentos realizados com 20UFC/teste	53
Tabela 9 - Resultados dos testes de associação entre os métodos nos experimentos realizados com 2UFC/teste	53
Tabela 10 -Resultados dos testes de associação entre os métodos nos experimentos realizados com 0,2UFC/teste	54
Tabela 11. Resultado final dos testes de associação entre os métodos nos experimentos.....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. MÉTODO DE INOCULAÇÃO	5
1.1.1. Método de Inoculação Direta.....	5
1.1.2. Método de Inoculação Indireta	6
1.2. TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	7
1.3. AMOSTRAGEM.....	9
1.4. MEIO DE CULTURA	10
1.4.1. CONTROLE NEGATIVO.....	12
1.4.2. CONTROLE POSITIVO	12
1.5. AMBIENTE	13
1.6. LIMITAÇÕES DO TESTE CONVENCIONAL E NECESSIDADE DE IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS	14
1.7. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS RÁPIDOS (MMR´S)	17
1.7.1. Frascos de Meio de Cultura e Mecanismo de Detecção	18
1.8. GENERALIDADES DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS RÁPIDOS E PERSPECTIVAS REGULATÓRIAS	22
1.8.1. Etapas da Validação de um Método Microbiológico Rápido	27
1.8.1.1. Qualificação de instalação	27
1.8.1.2. Qualificação de operação.	28
1.8.1.3. Qualificação de desempenho.....	29
2. OBJETIVO	33
3. MATERIAL E MÉTODO.....	34
3.1. EQUIPAMENTO UTILIZADO	34
3.2. MICRO-ORGANISMOS TESTE	34
3.3. INSTALAÇÕES E INSTRUMENTOS.....	35
3.4. TRANSPORTE DOS FRASCOS DE BACT/ALERT® CONTENDO INÓCULO	36
3.5. COLETA DE INÓCULO DOS TUBOS CONTENDO CALDO CASEÍNA SOJE E CALDO TIOGLICOLATO.....	37
3.6. MEIOS DE CULTURA E PRODUTOS	37

3.7.	MONITORAMENTO AMBIENTAL	41
3.8.	CONTROLE DE BIOBALLS® <i>SINGLESHOT</i>	42
3.9.	FASES EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO	42
3.10.	MÉTODO FARMACOPEICO – AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO	43
3.11.	MÉTODO RÁPIDO – BACT/ALERT®	45
3.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	46
4.	RESULTADOS	47
4.1.	QUALIFICAÇÃO DE INSTALAÇÃO	47
4.2.	QUALIFICAÇÃO DE OPERAÇÃO.....	47
4.3.	QUALIFICAÇÃO DE DESEMPENHO	48
4.4.	MONITORAMENTO AMBIENTAL	52
4.5.	CARGA MICROBIANA DOS LOTES DE BIOBALLS® <i>SINGLE SHOT</i> UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS	52
4.6.	TESTES ESTATÍSTICOS DE ASSOCIAÇÃO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES TESTADAS.....	53
4.7.	LIMITES DE DETECÇÃO.....	54
4.8.	TEMPOS DE DETECÇÃO.....	55
5.	DISCUSSÃO.....	62
5.1.	QUALIFICAÇÃO DE INSTALAÇÃO	62
5.2.	QUALIFICAÇÃO DE OPERAÇÃO.....	62
5.2.1.	Funcionamento do Equipamento.....	62
5.2.2.	Prova de Conceito.....	63
5.2.3.	Tratamento dos dados experimentais.	64
5.2.4.	Adequação do Protocolo Experimental	65
5.3.	QUALIFICAÇÃO DE DESEMPENHO	67
5.3.1.	Especificidade	67
5.3.2.	Limite de Detecção.....	68
5.3.3.	Robustez	69
5.3.4.	Equivalência.....	70
5.4.	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE VALIDAÇÃO DE BACT/ALERT®.....	73
6.	CONCLUSÃO	79
7.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	80

1. INTRODUÇÃO

Após Louis Pasteur, no século XIX, ter demonstrado que os micro-organismos responsáveis pela fermentação são provenientes do ar e não da geração espontânea, a microbiologia foi consolidada como campo de aplicação prática nos processos de fermentação de leite, cerveja e vinho; bem como na cirurgia e no tratamento de doenças infecciosas (CUNDEL, 2003).

O trabalho pioneiro de Pasteur pode também ser considerado como um marco na aplicação da microbiologia no meio industrial. Nesse contexto, juntamente com o trabalho de Robert Koch, de isolar e identificar micro-organismos, os métodos microbiológicos têm evoluído para métodos mais confiáveis.

As primeiras publicações influentes no desenvolvimento de métodos microbiológicos incluem, a primeira edição do *Standard Methods of Water Analysis*, em 1905 e do *Standard Methods of Bacterial Milk Analysis*, da *American Public Health Association*, a validação de métodos oficiais da *Association of Official Analytical Chemists*, em 1916, a primeira edição do *Journal of Bacteriology*, em 1916, o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, em 1923 e as Farmacopeias Britânica, de 1932 e Americana, 1936.

O primeiro método oficializado do teste de esterilidade teve origem na Inglaterra em 1932, e foi apresentado na *British Pharmacopeia* do mesmo ano exigia a execução em produtos sob a forma líquida, mediante utilização do caldo peptonado e incubação a 37°C durante 5 dias, com vista à detecção de bactérias aeróbicas (BRITISH PHARMACOPOEIA, 1932)

A edição da Farmacopeia Americana (USP) XI, em 1936, adotou a mesma metodologia. Na edição seguinte de 1942, o recurso analítico foi modificado para permitir o desenvolvimento de micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos, bem como os micro-aeróbicos. Na USP XIII, em 1947, a preocupação se estendeu para a detecção de fungos, utilizando-se de meio de cultura contendo mel, com incubação de 22 a 25°C, durante 15 dias.

No histórico das farmacopeias internacionais, a inovação mais marcante ocorreu com a introdução do método de inoculação indireta da amostra, inclusive com a adoção do sistema fechado na Farmacopeia Européia, em 1976, e na USP XX (1980).

Na USP XXIII (1985) estendeu-se também para o método indireto o período de incubação de 14 dias, exceto nos casos de esterilização térmica do produto acabado. A partir da Farmacopeia Americana XXVII (2004), o período de incubação seria sempre de 14 dias e, em caso de sub-cultura a transferência deveria ocorrer no 14º dia, ocasionando tempo total de incubação de 18 dias.

No Brasil, a metodologia da segunda edição da Farmacopeia Brasileira ocorria nos moldes da USP XV (1955) e a da terceira edição era idêntica à USP XIX (1975), visto ser tradução integral da mesma. À quarta edição (1988), foram incorporados detalhes e cuidados no que diz respeito ao procedimento, mantendo-se, porém o período de incubação nos moldes da edição anterior, ou seja, 7 dias no caso de método indireto e 14 dias para o método direto.

Atualmente, a quinta edição da Farmacopeia Brasileira (2010) preconiza a execução do teste nos moldes do teste harmonizado nas farmacopeias americana, européia e japonesa e requer período de incubação de 14 dias para método direto e indireto.

No contexto da produção de medicamentos e seus insumos, correlatos, cosméticos e seus adjuvantes, é de fundamental importância o controle da contaminação para que essa não afete a qualidade do produto e, principalmente, a segurança do paciente, uma vez que produtos que contêm contaminantes microbiológicos nem sempre apresentam alterações sensoriais evidentes (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Nos adultos saudáveis, o contato com produtos contaminados não representa problema sério a menos que o contaminante seja um micro-organismo patogênico.

Dessa forma, o nível de qualidade exigido pelas farmacopeias estabelece a carga de contaminação e o tipo de micro-organismos aceitáveis. Nesse contexto, o risco associado que o produto apresenta depende de fatores intrínsecos como o tipo de consumidor final (neonatos, crianças, idosos), o estado em que se encontra seu

sistema imunológico; o uso pretendido e grau de exposição e do tecido exposto (Farmacopeia Brasileira., 2010)..

A carga de contaminação tolerada será inversamente proporcional ao risco associado do produto e será maior 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 ainda menor quando em produtos que se destinam a áreas normalmente estéreis do corpo. A probabilidade de ocorrência de infecção mais séria está associada ao uso de produtos injetáveis contaminados, cujas conseqüências podem envolver até 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.

A esterilização é o processo no qual há destruição, inativação ou remoção de todas as formas viáveis de micro-organismos, incluindo esporos e formas vegetativas de bactérias, fungos (bolores e leveduras), protozoários e vírus, sem garantir a inativação de toxinas e enzimas celulares. Nesse contexto a morte microbiana é definida como, ausência de micro-organismos viáveis (BAIRD, 2004; Farmacopeia Brasileira, 2010.; Farmacopeia Americana, 2013).

O teste de esterilidade aplicado ao produto acabado deve ser somente considerado como último controle de uma série de controles e medidas nas quais a esterilidade é assegurada. O objetivo principal do teste de esterilidade no produto acabado é confirmar se um processo de esterilização validado foi executado da maneira correta (BOWMAN, 1969).

A afirmação sobre a esterilidade absoluta de um lote exigiria que todas as unidades fossem submetidas ao teste de esterilidade, o que não é aplicável. Segundo as farmacopeias brasileira e americana, a condição de esterilidade de um lote deve ser considerada com base 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 micro-organismos viáveis.

A inativação de micro-organismos segue uma lei exponencial e, dessa forma, há uma probabilidade de que micro-organismos possam sobreviver ao processo de esterilização. A garantia de esterilidade está relacionado ao conceito matemático de que a morte microbiana é uma função de probabilidade baseado no nível de exposição do micro-organismo ao agente letal.

Conforme definido pela Farmacopeia Brasileira, 5º edição, a garantia de esterilidade é *“o grau de garantia que o processo em questão esteriliza uma população de itens, sendo expresso como a probabilidade de um item não estéril naquela população”*.

Por exemplo, em processos de esterilização por calor úmido, espera-se que atendidas as combinações validadas de tempo e temperatura, que o nível de garantia de esterilidade atingido seja de no mínimo 10^{-6} , que é o mesmo nível de garantia de esterilidade requerido em processos de esterilização por radiação ionizante. (Farmacopeia Brasileira, 2010)

Nesses casos o nível de garantia de esterilidade de 10^{-6} , apesar de ser uma função probabilística, não significa necessariamente que uma unidade em um milhão pode estar contaminada, mas é um indicador da robustez do processo esterilizante (BAIRD, 2004).

Portanto, a segurança de um teste de esterilidade não está baseada no resultado final, mas sim no nível de segurança e conhecimento sobre o processo esterilizante. O teste de esterilidade só pode detectar micro-organismos capazes de crescer nos meios de cultura utilizados e a amostragem dá uma estimativa sobre a esterilidade de todas as unidades do lote. (BRYCE, 1956). Portanto, o teste de esterilidade deve se basear em 4 premissas:

- a) Que o processamento do produto ocorra adequadamente;
- b) Que as condições relacionadas ao teste (ambiente, operadores, materiais, equipamentos) estejam dispostas de maneira a eliminar o máximo possível dos contaminantes, para que não haja introdução de contaminação durante o teste;

- c) Que substâncias fungistáticas ou bacteriostáticas sejam neutralizadas e não interfiram no resultado do teste; e
- d) Que a amostragem seja adequada

1.1. MÉTODO DE INOCULAÇÃO

O teste de esterilidade abrange essencialmente 2 técnicas, que se diferenciam em como a amostra é inoculada no meio de cultura: diretamente, onde a amostra é colocada em contato direto com o meio de cultura, ou indiretamente, onde a amostra é filtrada e a membrana filtrante é inoculada no meio de cultura.

O teste se baseia no crescimento microbiano no meio de cultura e a confirmação do resultado positivo é feita pela avaliação visual do meio quanto à turvação por um período de 14 dias. (Farmacopeia Brasileira, 2010 ed.. Farmacopeia Americana, 2013,).

A escolha da técnica a ser utilizada é determinada por diversos fatores como a natureza da amostra e facilidade na execução da técnica.

1.1.1. Método de Inoculação Direta

Consiste na inoculação de quantidades/volumes pré-estabelecidos da amostra em volumes estipulados de meios de cultura na forma líquida com comprovada capacidade promotora de crescimento.

Para a avaliação da capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura, as farmacopeias preconizam a inoculação de cepas representativas de micro-organismos com carga de contaminação de 10 a 100 micro-organismos viáveis. Para ser considerado um meio promotor de crescimento, os meios de

cultura devem, necessariamente, apresentar crescimento após a incubação em condições apropriadas.

A transferência da amostra sob a forma líquida pode ser efetuada com auxílio de pipetas, seringas hipodérmicas ou diretamente vertida no recipiente do meio de cultura. No caso de produto sólido a transferência pode efetuar-se pelo uso de espátulas com volumes padronizados. Todas as farmacopeias indicam a quantidade de alíquotas a serem transferidas aos meios de cultura a partir de cada amostra representativa do lote. (Farmacopeia Brasileira, 2010; Farmacopeia Americana 2013; JAPANESE PHARMACOPEIA, 2011)

Uma vez que a alíquota da amostra é colocada em contato direto com o meio de cultura, eventualmente alguns cuidados podem ser necessários: utilização de tensoativos para auxílio na solubilização de lipófilas no meio de cultura e utilização de agentes neutralizadores de substâncias antimicrobianas presentes na amostra.

1.1.2. Método de Inoculação Indireta

Consiste da filtração da amostra em membrana filtrante e inoculação da membrana em meio de cultura. Os meios de cultura devem ser estéreis e com comprovada capacidade promotora de crescimento.

A avaliação da capacidade promotora dos meios de cultura é a mesma do método de inoculação direta.

O método de inoculação indireta permite o tratamento prévio da amostra com solubilização, ou lavagem em líquidos fisiológicos, seguida de filtração e inoculação da membrana filtrante no meio de cultura. A membrana empregada é constituída de ésteres de celulose ou de materiais sintéticos que resistam, por exemplo, a produtos oncológicos extremamente agressivos, com diâmetro de 47 mm, de borda hidrofóbica e tamanho de poro de $0,45 \pm 0,2 \mu\text{m}$.

Os sistemas filtrantes empregados no controle de qualidade de medicamentos podem ser múltiplos ou unitários, necessitando basicamente de porta-filtro e recipiente para transferência da amostra, ou líquidos de lavagem. O filtrado poderá ser recolhido em frasco coletor único ou individualizado. Antes da utilização do sistema, deve-se montá-lo e esterilizá-lo em autoclave, observando-se o tempo de esterilização, a fim de não ultrapassar o exigido para cada tipo de membrana. O processo de filtração é realizado por pressão negativa, com valor da ordem de 70 cm de Hg e vazão de 55 a 75 mL por minuto. Portanto, as amostras devem ser hidrossolúveis ou solúveis em solventes apropriados.

Quando há substância causadora de fungistase/bacteriostase, após a filtração pode-se lavar a membrana com solução peptonata contendo inativadores ou solubilizantes específicos. Nesses casos, deve-se efetuar estudo prévio para se determinar volume e número de lavagens suficientes para a eliminação total da substância.

O método indireto, frente ao método direto, apresenta maior facilidade para inativação de substâncias que inibam o crescimento microbiano e permite testar amostras de volume maior, aumentando a probabilidade de detecção de contaminantes, apresentando especial aplicação para avaliação de soluções parenterais de grande volume (SPGV).

O emprego de filtração em sistema fechado minimiza a ocorrência de contaminação ambiental e facilita a parte operacional do teste, uma vez que a membrana permanece inserida no cartucho, não sendo manipulada.

1.2. TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

Durante o período de incubação, além de fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos micro-organismos, disponíveis no meio de cultura, é preciso promover condições adequadas de temperatura e tempo necessário para desenvolvimento dos micro-organismos. A temperatura influencia diretamente a

absorção de nutrientes e a velocidade das reações intracelulares, exercendo diretamente efeito sobre o crescimento e a sobrevivência dos micro-organismos. Cada micro-organismo apresenta características específicas quanto à:

- a) Temperatura abaixo da qual não ocorre o crescimento;
- b) Temperatura ótima de crescimento onde as multiplicações celulares estão na máxima velocidade; e
- c) Temperatura acima da qual não é mais possível o crescimento, provavelmente devido à desnaturação de macromoléculas.

Os micro-organismos podem ser classificados, de acordo com sua temperatura ótima de crescimento, em três grupos:

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

Para detecção de bactérias o meio de tioglicolato é incubado a temperaturas entre 30-35°C.

Para detecção de fungos, leveduras e bactérias o meio de caseína soja é incubado a temperaturas entre 20-25°C.

No decorrer das revisões farmacopeicas houve mudanças, tendo sido adotados os períodos de 7, 10 e 14 dias de incubação.. A partir da 27ª edição da Farmacopeia Americana o período de incubação de 14 dias passou a ser exigência para o método de inoculação direto e indireto.

Atualmente, no Brasil, a Resolução RDC 48/2011 publicada em 20/09/2011 requer que o período de incubação na análise da esterilidade de todas as soluções parenterais de grande volume seja de 14 dias conforme disposto na quinta edição Farmacopeia Brasileira.

Por um lado, considerando-se que o micro-organismo se encontre na temperatura ótima de crescimento, o tempo é fator muito importante, pois a observação do crescimento microbiano é visual e, portanto, o tempo de observação do teste deve ser suficiente para que o micro-organismo, se houver, se multiplique em quantidade que seja detectável seu crescimento a olho nú, o que é aproximadamente 10^6 células/mL de solução. Entretanto, foi verificado que as condições de incubação $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e $32 \pm 2^\circ\text{C}$ nos moldes de execução do teste de esterilidade da Farmacopeias Americana, Européia e Japonesa provem melhores resultados para detecção de micro-organismos. (BUGNO e PINTO, 2003)

Ao se considerar que, caso haja carga microbiana viável mesmo após esterilização do produto, o micro-organismo estará estressado e, portanto, sua taxa de crescimento será reduzida, é de fundamental importância que o período de incubação seja suficiente para que haja crescimento observável de micro-organismos (BATHGATE et al. 1993). O período de incubação de 14 dias descrito nas farmacopeias é uma medida de segurança para garantir que o teste seja capaz de detectar micro-organismos de crescimento lento. (MOLDENHAUER e SUTTON, 2004; RAPPÉ e GIOVANNONI, 2003).

1.3. AMOSTRAGEM

A amostragem é uma limitação do teste de esterilidade, pois uma vez que o teste é destrutivo não é possível fazer o teste com todas as unidades do lote.

Portanto, o resultado do teste é determinado pelo número de amostras retiradas e pelo grau de contaminação de cada amostra.

O tamanho apropriado de amostragem para o teste de esterilidade foi foco de discussão entre fabricantes e autoridades regulatórias no que se refere a produtos parenterais (BOWMAN, 1969).

Em termos matemáticos, se n é o número de amostras testadas, p a proporção de amostras contaminadas e q a proporção de amostras não contaminadas, portanto:

$$p + q = 1$$

Portanto deduz-se que a probabilidade de rejeição de um lote é:

$$1 - (1 - p)^n$$

Considerando que o teste de esterilidade é um teste que está sujeito à falhas, as farmacopeias permitem o reteste, exeto quando executado em um isolador. Nesse caso, a probabilidade de liberar um lote contaminado no primeiro reteste é (BAIRD, 2004):

$$(1 - p)^n [2 - (1 - p)^n]$$

Portanto, a probabilidade em aceitar um lote com uma porcentagem de amostras contaminadas está diretamente relacionada com o tamanho da amostragem e não essencialmente com o tamanho do lote. (KNUDSEN, 1942)

1.4. MEIO DE CULTURA

Os meios de cultura empregados devem fornecer nutrientes necessários para o desenvolvimento dos micro-organismos, pH adequado e substâncias que neutralizem produtos do metabolismo microbiano, que quando acumulados, podem limitar o seu desenvolvimento. A concentração de cada componente do meio de cultura deve ser adequadamente balanceada, não sendo tão baixa, a ponto de limitar o crescimento microbiano, nem tão alta, que possa inibir seu crescimento.

A partir de 1947, a 13ª edição da Farmacopeia americana adotou o caldo de Tioglicolato também denominado de meio Brewer modificado. Este meio possibilita

condições de anaerobiose e aerobiose em um único 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.

Em 1970, a 18ª edição da Farmacopeia Americana introduziu o caldo de caseína soja que permite o crescimento de bactérias aeróbicas, bolores e leveduras.

Sabe-se que, pelas condições de incubação e de composição do Caldo de Caseína Soja, este visa à detecção de bactérias aeróbicas e psicrofílicas, podendo abranger também os fungos. Porém, no que diz respeito à seletividade para com bolores e leveduras, é assunto questionável, visto que os valores de pH ótimos para crescimento de fungos são da ordem de 5 a 6 ou ainda mais baixos, enquanto que o pH deste meio é de aproximadamente 7,3. (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010)

Atualmente, as farmacopeias (Farmacopeia Brasileira, 2010; Farmacopeia Americana, 2013 e Farmacopeia Japonesa, 2011) exigem que seja empregado no mínimo 2 tipos de meios de cultura (Caldo caseína soja e Caldo Tioglicolato), na forma líquida, que permitam o desenvolvimento de bactérias e fungos.

Atualmente as Farmacopeias Brasileira 5ª edição e Americana 33ª edição preconizam a utilização de meios modificados para penicilinas e cefalosporinas em método de inoculação direta. Nesse caso, a orientação é de se adicionar β -lactamase em quantidade suficiente para inativar a atividade bacteriostática do meio. (Farmacopeia Brasileira, 2010; Farmacopeia americana, 2013)

A preocupação inerente aos meios de cultura é a comprovação de sua eficácia, ou capacidade promotora de crescimento, o que deve ser verificado para cada lote, considerando-se não apenas o lote comercial do meio de cultura, mas também o lote de preparo do mesmo. Além disso, os meios devem ser controlados quanto à sua esterilidade, de forma a conferir segurança quanto à ausência de resultados falso-positivos no teste e sua capacidade.

Os meios preparados podem ser estocados desde que cumpram as seguintes condições: quando em embalagens não hermeticamente fechadas, podem ser

utilizados por até 30 dias, desde que sejam testados para promoção de crescimento dentro de 15 dias a partir do primeiro uso e que cumpram o requisito para indicador de cor. Quando em frascos hermeticamente fechados, poderão ser utilizados por 365 dias, desde que sejam testados para promoção de crescimento em três meses a partir do primeiro uso e que cumpram o requisito de indicação de cor. (Farmacopeia Brasileira, 2010)

1.4.1. CONTROLE NEGATIVO

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 (Farmacopeia Brasileira, 2010)

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

1.4.2. CONTROLE POSITIVO

Os controles positivos são obtidos pela inoculação de 10 a 100 Unidades Formadoras de Colônia (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 (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. (Farmacopeia Brasileira, 2010)

1.5. AMBIENTE

Um fator crítico relacionado ao teste de esterilidade refere-se às condições em que é executado. É axiomático dizer que, para obter testes de esterilidade confiáveis, os mesmos devem ser feitos em ambientes estéreis (BOWMAN, 1969)

Conforme definido pela International Organization for Standardization, sala limpa pode ser definida como: *“sala na qual a concentração de partículas no ar é controlada e que é construída e usada de modo a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas dentro desta e nos quais outros parâmetros relevantes como temperatura, umidade e pressão são controlados quando necessários”* (ISO 14644-1, 2007).

Apesar de o conceito de teste de esterilidade ser simples, na prática requer operadores devidamente treinados, um ambiente asséptico adequado (capela de fluxo de ar unidirecional e sala limpa) monitoramento ambiental rotineiro e registros de falha de operação para avaliar a necessidade de requalificação dos operadores ou manutenção dos equipamentos (BAIRD, 2004 e BRYCE, 1956).

Mais especificamente, conforme Farmacopeia Brasileira 5ª edição, os testes de esterilidade devem ser realizados sob condições assépticas, utilizando, por exemplo, capela de fluxo laminar classe II tipo A (máximo 3520 partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$), que deve estar instalada em sala limpa classe B – ISO 7 (máximo 352000 partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$). Para testes de esterilidade de fármacos oncogênicos, mutagênicos, antibióticos, hormônios, esteróides e outros, os testes devem ser realizados em capela classe II tipo BII, que possui sistema de exaustão externo ao

ambiente do laboratório. Não devem ser realizados testes sob exposição direta de luz ultravioleta ou em áreas sob tratamento de aerossóis. (Farmacopeia Brasileira, 2010)

1.6. LIMITAÇÕES DO TESTE CONVENCIONAL E NECESSIDADE DE IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS

Métodos microbiológicos, historicamente, demandaram mais tempo quando comparados aos métodos físico químicos, pois são baseados na observação visual do crescimento microbiano, sendo portanto, responsáveis pelo maior tempo de liberação de lote de produtos farmacêuticos.

Considerando-se os 14 dias requeridos pelas farmacopeias para a execução do teste de esterilidade, no cenário industrial, esse tempo se traduz em custos de inventário, armazenamento e logística, além da demanda intrínseca de espaço, o que faz com que os métodos microbiológicos baseados nas técnicas desenvolvidas no século XIX não atendam plenamente as demandas de competitividade impostas às indústrias farmacêuticas.

Observa-se que no histórico do desenvolvimento do teste de esterilidade diversas alterações foram realizadas, visando sempre a segurança e a qualidade do processo esterilizante e considerando os aspectos probabilísticos da esterilização e o de re-contaminação.

É importante ressaltar que, a descoberta e o cultivo de micro-organismos novos sofreram mudança de paradigma em 1985 quando Norman Pace publicou que a grande maioria da diversidade microbiana que não é cultivável poderia ser estudada, utilizando-se biologia molecular (RAPPÉ e GIOVANNONI, 2003).

A variedade taxinômica de micro-organismos em um local é incontável e o número e diversidade de micro-organismos presentes nesse local é muitas vezes maior do que se pode contar em uma amostragem (HUGHES *et. al.*, 2001)

Estima-se que mais de 99% dos micro-organismos observáveis na natureza não são cultiváveis pelas técnicas de cultivo conhecidas (HUGENHOLTZ, GOEBEL e PACE, 1998 e AMANN, LUDWING e SCHLEIFER, 1995) e as condições de incubação, composição do meio de cultura e temperatura de incubação influenciam nos resultados dos testes (ABDOU, 1974).

Tal fato evidencia limitação do teste que não é capaz de detectar a maioria das bactérias e fungos (bolores e leveduras) e vírus, reafirmando o conceito de que o teste de esterilidade não tem caráter confirmatório da esterilidade de um produto, mas constitui uma medida de monitoramento do processo esterilizante.

A constatação de que o teste de esterilidade possui limitações de ordem técnica e o tempo requerido para liberação de resultados motivaram o desenvolvimento da liberação paramétrica para produtos de esterilização terminal.

A liberação paramétrica é definida como a liberação da carga ou lotes de produtos submetidos à esterilização terminal, por meio do cumprimento de parâmetros críticos do processo de esterilização, sem a necessidade de realização do teste de esterilidade (Farmacopeia Brasileira, 2010).

A liberação paramétrica se aplica a produtos submetidos à esterilização terminal e, conforme definido na *International Standardization Organization* (ISSO 14937, 2000), é o resultado de um conhecimento profundo do processo esterilizante, embasado em dados confiáveis de que a cada etapa do processo, quando todos os parâmetros críticos apresentam resultados conforme, estabelecido durante a validação do processo esterilizante.

Portanto, com base em evidências e na garantia de que o processo esterilizante atingiu todos os parâmetros críticos de processo, o produto com esterilização terminal pode ser liberado sem a necessidade de se fazer o teste de esterilidade.

O sistema de liberação paramétrica deve conferir a garantia de que o produto possui a qualidade planejada baseada nas informações adquiridas durante o processo industrial e em conformidade com as Boas Práticas de Fabricação

Exemplificando, a Baxter Healthcare® teve aprovação regulatória da FDA (*Food and Drug administration*) para implementar a liberação paramétrica em 1985.

O laboratório Abbott® foi o segundo a obter essa aprovação pela FDA, tendo ocorrido somente 15 anos depois.

Após a publicação, em 2004, do “*Asseptic Processing Guidance*” pela FDA, o CDER (Center for Drug Evaluation and Research) detectou falta de garantia de esterilidade nos produtos submetidos à esterilização terminal, o que desencadeou a ocorrência de recolhimento. Tal fato fez com que a liberação paramétrica fosse abordada com mais cautela pelas agências regulatórias. (GRESSETT, VANHAECKE e MOLDENHAUER, 2008; KIELPINSKI, 2005)

No Brasil, a liberação paramétrica ainda não é regulamentada.

Vale ressaltar que a liberação paramétrica somente se aplica a produtos esterilizados terminalmente. Quando se considera a avaliação de materiais biológicos que são termolábeis e que requerem característica de esterilidade, deve-se levar em conta que a sua viabilidade muitas vezes tem tempo inferior ao tempo requerido para o teste convencional e o material pode não resistir em quarentena pelo período de tempo requerido pelo teste. (GRESSETT, VANHAECKE e MOLDENHAUER, 2008; KIELPINSKI, 2005).

Soma-se à lista de limitações, o fato de o teste ser requerido na embalagem final, em estágios específicos da produção, para grande parte dos produtos biológicos administrados via parenteral (PARVEEN *et. al.*, 2011).

Portanto, considerando tais condições, o teste de esterilidade ainda se faz necessário. Dessa forma, a necessidade de resultados mais rápidos, devido à crescente competitividade na indústria farmacêutica ao longo do século XX e XXI, além da demanda, cada vez maior da avaliação de esterilidade de produtos biológicos, voltou o foco de vários pesquisadores para a melhoria de métodos a fim de torná-los mais rápidos, sensíveis e específicos conferindo maior segurança aos resultados, bem como relação mais favorável custo/benefício em sua execução.

1.7. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS RÁPIDOS (MMR'S)

Os Métodos Microbiológicos Rápidos (MMR's), essencialmente, se baseiam na fisiologia celular dos micro-organismos, podendo estar relacionada à detecção de metabólitos excretados (ex: dióxido de carbono) ou de componentes celulares (ex: ATP, cadeias lipídicas, dentre outros). Nesse contexto, os MMR's compõem duas vertentes: as que dependem do crescimento microbiano e as que não dependem.

A BD (Becton Dickinson Company dos Estados Unidos) foi a primeira companhia a automatizar o teste de cultura em sangue nos laboratórios clínicos, desenvolvendo um instrumento, em 1971, que identificava o crescimento microbiano através da detecção radiométrica do CO₂ produzido pelos micro-organismos. O sucesso desse tipo de tecnologia na área clínica resultou em sua aplicação no segmento industrial.

Posteriormente a Biomerieux® disponibilizou no mercado equipamento de conceito semelhante em que a detecção de crescimento microbiano é feita por método colorimétrico, o Bact/Alert®.

Se existirem micro-organismos na amostra testada, dióxido de carbono é produzido, uma vez que os micro-organismos metabolizam os substratos existentes no meio de cultura. Ao produzir CO₂, a cor do sensor existente no fundo de cada frasco de cultura muda de azul para amarelo. Um díodo emissor de luz (LED) projeta luz sobre o sensor. A luz refletida é medida por um fotodetector. Essa informação é comparada com a leitura inicial do sensor. Se existir um elevado teor inicial de CO₂, e/ou uma taxa elevada anormal de produção de CO₂ e/ou uma taxa sustentada de produção de CO₂, a amostra é considerada positiva.

O Sistema de Detecção Microbiana BacT/Alert® (BCTA) é um sistema de teste totalmente automatizado capaz de incubar, agitar e monitorar de forma contínua os meios aeróbicos e anaeróbicos inoculados com:

- Produtos de pacientes suspeitos de bacteremia, fungemia e/ou micobacteriemia (Utilização Clínica); ou

- Amostras monitoradas para detecção de contaminação bacteriana ou fúngica (Utilização industrial).

1.7.1. Frascos de Meio de Cultura e Mecanismo de Detecção

Os frascos de meio de cultura padrão de BCTA aeróbicos e anaeróbicos possuem composição quali e quantitativa semelhante aos meios Caseína soja e Tioglicolato. Tendo em vista a aplicação clínica do método, ambos os meios aeróbicos e anaeróbicos de BCTA possuem Polianetol Sulfato de Sódio (SPS), de efeito anticoagulante em hemocultura, favorece o cultivo dos micro-organismos graças à ação anticomplementar, antifagocitária, e inibitória da atividade antimicrobiana dos amióglicosídeos ou drogas que podem estar presentes no sangue dos pacientes. Os SPS (figura 1) previne a morte bacteriana por fatores humorais e celulares do sistema imune inato. É o anticoagulante mais comumente utilizado em hemoculturas.(PALARASAH, 2010).

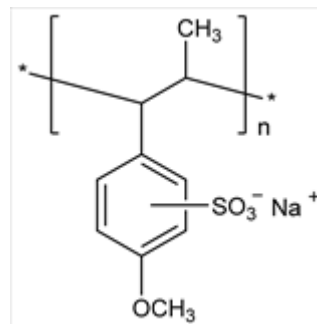


Figura 1 - Estrutura Química do Polianetol Sulfato de Sódio (SPS)

Outra diferença é que o meio anaeróbico não possui rezazurina, indicador de limite entre presença/ausência de oxigênio e ágar bacteriológico para redução da difusão de oxigênio no meio de cultura. Nos frascos de cultivo de micro-organismos anaeróbicos verifica-se que, além da presença do SPS, são adicionadas as

substâncias hemina e menadiona, nutrientes importantes para o metabolismo de bactérias anaeróbicas estritas (ROLF, 1978)

O meio anaeróbico em si conforme declarado pelo fabricante, possui “agentes redutores” podendo-se considerar que desempenha a mesma função do tioglicolato.

Conforme declarado pelo fabricante do equipamento o sistema de detecção microbiana é usado para determinar se há micro-organismos presentes no sangue ou em outras amostras de fluidos corporais estéreis retirados de um paciente suspeito de ter bacteremia/fungemia, que são definidos como a presença de bactérias e/ou fungos na corrente sanguínea. (MURRAY, *et. al.* 1998)

Todas as particularidades referentes à aplicação clínica do método se devem ao fato de seu desenvolvimento e aplicação inicial serem direcionados para utilização clínica e após anos de utilização nesse meio, atualmente há grande foco para utilização desse método na área de Controle de Qualidade de Medicamentos.

O fabricante declara que é possível que micro-organismos raros e exigentes não cresçam ou cresçam lentamente nos meios de cultura de Bact/Alert®. Nesses casos, deve-se recorrer a métodos alternativos ou aumentar o tempo de inoculação das amostras.

O fabricante do equipamento BCTA oferece distintas opções de meios de cultura. Por exemplo, alternativamente aos frascos padrões de meio de cultura Bact/Alert® existem os frascos FAN aeróbico e anaeróbico que possuem carvão ativo e uma substância chamada Ecosorb®, cuja função é inativar a ação de produtos que causem fungistase e bacteriostase.

Foi confirmado que frascos tipo FAN, quando comparados com frascos tipo Bact/Alert®, tanto aeróbico quanto anaeróbico, recuperam um maior número de micro-organismos quando comparados aos frascos padrão, mas os mecanismos ainda não são bem definidos, principalmente quanto à contribuição de cada componente do meio de cultura para que isso ocorra. (GIBB; HILL e CHOREL, 1998)

Cada frasco de meio de cultura onde as amostras testadas são inoculadas, contém uma membrana na parte inferior do frasco, que fica impregnada de vapor d'água após a autoclavação do frasco. Essa membrana é impermeável a íons, mas é permeável às moléculas de CO₂. A medida que o CO₂ é liberado pelo metabolismo

ativo dos micro-organismos, se difunde pela membrana e interage com as moléculas de água ali impregnadas, gerando íons hidrogênio, conforme reação química da figura 2:

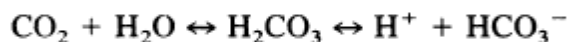


Figura 2 - Produção de íons hidrogênio na presença de CO_2

Os íons de hidrogênio livres interagem com a membrana, que no seu estado alcalino tem coloração azulada/verde escuro e muda de cor para verde claro/amarelo à medida que a concentração de dióxido de carbono aumenta, conforme pode ser verificado na figura 3.



Figura 3 - Frascos de meio de cultura de Bact/Alert[®] respectivamente em pH ácido e pH alcalino.

O frasco inoculado é colocado no aparelho, onde é incubado e monitorado a cada 10 minutos, quanto à presença de micro-organismos presentes no meio de cultura, através de registro da reflectância do frasco na memória do aparelho. Nos intervalos de monitoramento, um led de emissão de luz vermelha emite luz na

membrana do frasco e a reflectância é detectada por fotodíodo de absorção de luz vermelha que produz uma voltagem proporcional à intensidade da luz refletida e consequentemente à concentração de dióxido de carbono presente no meio, conforme ilustrado na figura 4.

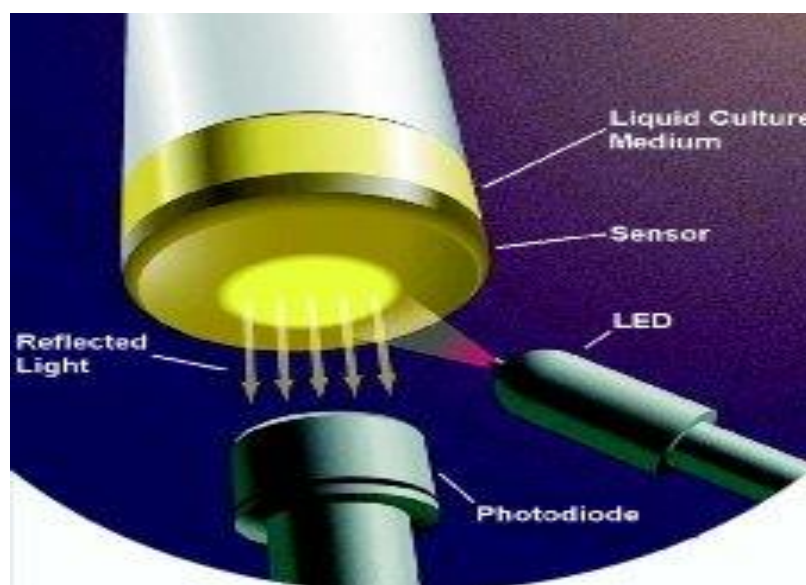


Figura 4 - Mecanismo de detecção de alteração de pH nos frascos de meio de cultura de Bact/Alert®

A temperatura de incubação do equipamento pode ser ajustada, individualmente para cada estufa de incubação (THURMAN, 1990).

Os sinais registrados são analisados por 3 algoritmos matemáticos diferentes para identificação do crescimento microbiano. Os algoritmos matemáticos se baseiam somente na taxa da intensidade do sinal da reflectância ao longo do tempo, conforme figura 5:

- a) Algoritmo fase log: Aceleração de crescimento;
- b) Algoritmo fase log: Multiplicação; e
- c) Algoritmo fase estacionária: Fase estacionária.

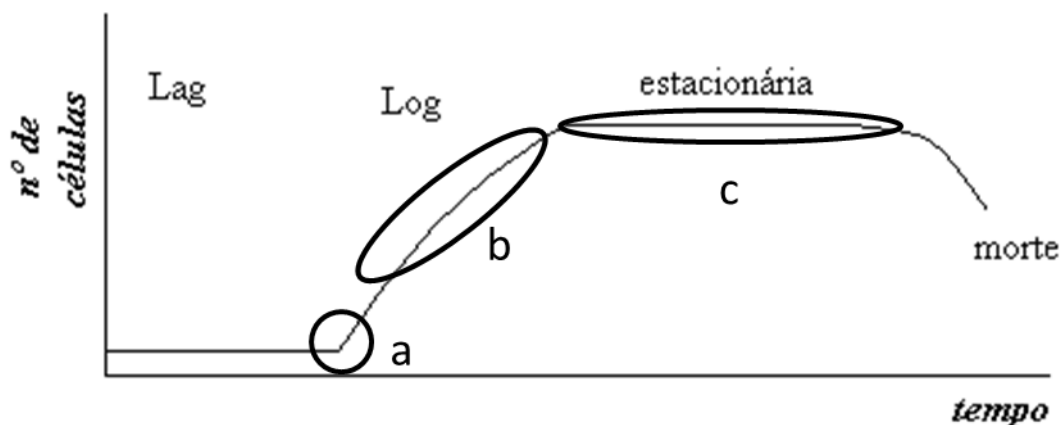


Figura 5 - Algoritmos de detecção de crescimento microbiano em diferentes etapas

O equipamento é disponibilizado pela empresa com os algoritmos padrões de detecção e com os algoritmos otimizados para detecção mais rápida de grupos específicos de micro-organismos, por exemplo os algoritmos para detecção de micro-organismos de crescimento lento. (KIELPINSKI, 2005)

1.8. GENERALIDADES DA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS RÁPIDOS E PERSPECTIVAS REGULATÓRIAS

O termo “validação” foi definido no “*Guideline on General Principles of Process Validation*” em 1987, pela FDA como “*evidência documentada que dê com alto grau de garantia que um processo em específico irá produzir consistentemente um produto dentro de parâmetros de qualidade bem determinados.*”.

Na Resolução da Diretoria Colegiada, RDC 17/10 'validação' está definida como: *“ato documentado, que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material ou sistema realmente é consistentemente e leva aos resultados esperados.”*

Portanto, a validação deve apresentar informações detalhadas que comprovem, com alto nível de segurança, que o procedimento específico tem desempenho consistente para encontrar as especificações pré-determinadas e atributos de qualidade para a aplicação analítica intencionada. Dois componentes críticos de qualquer validação são: a adequação do processo (o que se propõe a fazer) e a reprodutibilidade. Entretanto, para testes novos, é importante demonstrar a adequação do método à aplicação analítica pretendida e seu desempenho com o mesmo padrão de qualidade ao longo do tempo. (Farmacopeia Americana, 2013; *EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods*, 2000).

Embora vários guias forneçam parâmetros específicos para a validação de métodos químicos, como Farmacopeia Americana 2013 (Capítulo <1225> *Validation of Compedial Methods*), *International Conference Harmonization (ICH) (Validation of Analytical Methods)* e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Guia para qualidade em química analítica), isso não se aplica aos métodos microbiológicos.

Considerando que estes são inerentemente diferentes dos métodos químicos, nem sempre é fácil adequar os critérios e procedimentos para validação de métodos microbiológicos. Muitos métodos microbiológicos convencionais estão sujeitos à variabilidade técnica entre os analistas, ao fato da contaminação microbiana não necessariamente estar igualmente distribuída em toda a alíquota ou na amostra e à variabilidade devida à natureza da substância a ser analisada. (Farmacopeia Americana, 2013; FDA 2008; *EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods*, 2000).

No método farmacopeico (MFCP), a detecção do crescimento microbiano é feita através da avaliação visual do meio quanto à turvação, que representa crescimento microbiano. No método rápido, a detecção do crescimento microbiano é feita através da detecção de mudança de cor de um indicador colorimétrico, sensível à mudança de pH que fica em contato com o meio de cultura. Portanto, apesar de se

tratarem de métodos diferentes, conceitualmente a maior diferença é no método de detecção de crescimento.

Considerando a similaridade e o propósito entre os métodos, podemos, analogamente, definir questões primárias quanto à execução da valiação:

- a) O método rápido tem a capacidade de detectar todas as cepas microbianas que o método farmacopeico detecta?
- b) O método rápido tem a capacidade de detectar a menor carga de contaminação possível de todas as cepas microbianas testadas, que o método farmacopeico detecta?
- c) O método rápido suporta as variações que o método farmacopeico suporta?
- d) O método rápido é aplicável às características da amostra que será testada?
- e) O método rápido suporta o número de testes que será realizado?

Essas são premissas essenciais para a comparação e para o protocolo de validação do método rápido. Como o MFCP já é um método validado, amplamente conhecido e aceito pelos laboratórios microbiológicos e pelas agências regulatórias, após verificação das premissas essenciais já expostas há um questionamento secundário, que visa verificar a relação custo-benefício na implementação do método rápido:

- a) O método rápido oferece resultados de forma mais rápida e confiável do que o método farmacopeico?
- b) A redução no tempo das análises *versus* o custo dos reagentes/manutenção do equipamento justifica a implantação do método?
- c) O método rápido apresenta condições que reduzam manuseio/risco de contaminação da amostra frente ao Método Farmacopeico?

d) Haverá suporte técnico e fornecimento de reagentes a médio e longo prazo?

Nesse contexto, recomenda-se a utilização de teste de esterilidade alternativo ao MFCP somente mediante comprovação de que o método alternativo seja, no mínimo, equivalente aos métodos já descritos na Farmacopeia (Farmacopeia Americana, 2013; FDA 2008; EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods, 2000).

No item *Alternative and Harmonized Methods and Procedures* na seção *Testing Practices and Procedures em General Notices* da Farmacopeia Americana, 2013, define-se que os métodos alternativos devem ser usados se fornecerem vantagens com relação aos métodos convencionais, se estiverem validados e demonstrarem resultados equivalentes ou melhores que os métodos convencionais. (Farmacopeia Americana, 2013)

Considerando as perspectivas regulatórias nos Estados Unidos, o CBER (“*Center for Biologics Evaluation and Research*”) e o CDER (“*Center for Drug Evaluation and Research*”) da FDA não aprovam um método microbiológico alternativo por si só, apenas de forma combinada com o produto que esterilizam.

O Bact/Alert® já foi validado para aplicação como teste de esterilidade em culturas de condrócitos. Nesta validação, o método foi desafiado quanto à gama de micro-organismos detectáveis, à carga mínima de contaminação detectável, ao tempo de detecção dos micro-organismos, inclusive de crescimento lento, e ao efeito da matriz da amostra no resultado do teste. Somente com evidências suficientes de que o teste poderia ser considerado equivalente ao teste farmacopeico, a FDA aprovou sua utilização (KIELPINSKI *et. al.*, 2005).

A utilização de Bact/Alert® também foi validada para aplicação na detecção de contaminação microbiana em culturas de sangue. A validação demonstrou que, com carga microbiana baixa, houve detecção de crescimento microbiano no primeiro dia e, quando avaliado utilizando-se micro-organismo de crescimento lento (*P. acnes*), esse período foi de 6 dias (MASTRONARDI *et. al.*, 2010).

Quando desafiado quanto ao limite de detecção de Bact/Alert®, foi demonstrado estatisticamente que esse método tem limite de detecção de uma Unidade Formadora de Colônia (UFC) (VERDONK *et. al.*, 2010).

Soluções parenterais de grande volume (SPGV) são produtos de grande consumo e sua produção demanda muito espaço para armazenamento devido ao período de quarentena requerido para liberação de lotes, enquanto aguardam resultados do teste de esterilidade.

Anualmente, a produção de fluido de diálise é de, aproximadamente, 25×10^9 litros por ano, o que faz deste o produto de maior volume utilizado pela medicina (NYSTRAND, 2008).

Acredita-se que a validação do método rápido aplicado às SPGV's venha a contribuir para a maior agilidade e segurança na execução dos testes de esterilidade.

Entretanto, verifica-se que o posicionamento das autoridades regulatórias dá preferência à utilização de métodos farmacopeicos, por terem reconhecida segurança e serem amplamente adotados pelos laboratórios de controle microbiológico.

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada nº17/10 estabelece que os testes de esterilidade devam ser validados para cada produto e que os métodos farmacopeicos devem ser utilizados para validação e desempenho do teste de esterilidade (BRASIL, 2010). Já a quinta edição da Farmacopeia Brasileira não possui nenhum capítulo sobre a validação de métodos alternativos. Portanto, a falta de regulamentação referente à utilização de métodos microbiológicos rápidos denota que as autoridades regulatórias ainda são resistentes quanto à sua utilização no Brasil.

Uma vez que as autoridades regulatórias são resistentes à implementação de métodos microbiológicos alternativos aos descritos nas farmacopeias, o presente trabalho também se justifica por contribuir de forma crítica com informações que possam dar maior entendimento sobre BCTA e conseqüentemente, ser mais uma fonte de embasamento técnico-científico para as autoridades regulatórias brasileiras.

1.8.1. Etapas da Validação de um Método Microbiológico Rápido

A validação do método microbiológico rápido deve ir além do estudo da nova metodologia propriamente dita, deve considerar o processo como um todo, avaliando todos os aspectos relativos ao novo método: qualificação de instalação, operação e desempenho; suporte para implementação do novo método pelo fabricante; operacionalização na rotina do laboratório e avaliação de potencial aceitabilidade regulatória.

O plano de validação deve incluir todas as etapas referentes ao método, verificando se todas as etapas de execução e implementação do novo método foram analisadas em profundidade, antes de se prosseguir com a implementação do método propriamente dito.

A validação de métodos microbiológicos rápidos aplicados na indústria farmacêutica pode ser realizada segundo parâmetros e procedimentos descritos na 33ª edição da Farmacopeia Americana ou no documento *EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods*. Primeiramente, o plano de validação deve documentar e planejar objetivos métodos e critérios de aceitação nas etapas do plano de validação.

1.8.1.1. Qualificação de instalação

Conforme a RDC 17/10, qualificação de instalação é “conjunto de operações realizadas para assegurar que as instalações (tais como equipamentos, infraestrutura, instrumentos de medição, utilidades e áreas de fabricação) utilizadas nos processos produtivos ou em sistemas computadorizados estão selecionados apropriadamente e corretamente instalados de acordo com as especificações estabelecidas (BRASIL, 2010)

Portanto, deve-se verificar e documentar que o sistema foi instalado em condições adequadas para seu correto funcionamento. Essas condições devem ser analisadas em conjunto com o fabricante do equipamento e qualquer condição que seja diferente do previsto pelo mesmo deve ser cuidadosamente analisada, documentada e justificada. Deve haver um protocolo e normas disponibilizadas pelo fabricante do equipamento que deixem claro as responsabilidades do usuário e do fabricante, as especificações do equipamento e os requerimentos de sua instalação.

1.8.1.2. Qualificação de operação.

Conforme RDC 17/10, qualificação de uma operação é o “*conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, que o sistema ou subsistema opera conforme previsto, em todas as faixas operacionais consideradas. Todos os equipamentos utilizados na execução dos testes devem ser identificados e calibrados antes de serem usados.*” (BRASIL, 2010)

Portanto, deve-se verificar e documentar que o sistema, métodos e instrumentação funcionam adequadamente. Nessa fase devem ser avaliados a calibração do equipamento o funcionamento do software e a faixa de trabalho do método.

Nesse contexto, considera-se como a etapa secundária da qualificação de uma operação a Prova de Conceito.

O objetivo da prova de conceito, segundo, o *EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods*, é verificar se o método tem potencial para ser validado e desafiado conforme os parâmetros de validação definidos.

Isso inclui, avaliação do funcionamento do equipamento; adequabilidade do protocolo experimental, inclusive método de inoculação, materiais utilizados, diluições, transferência de amostra e acompanhamento dos resultados.

1.8.1.3. Qualificação de desempenho

Conforme RDC 17/10, a qualificação de desempenho é a “*verificação documentada que o equipamento ou sistema apresenta desempenho consistente e reprodutível, de acordo com parâmetros e especificações definidas, por períodos prolongados. Em determinados casos o termo “validação de processo” também pode ser utilizado.*” (BRASIL, 2010)

Portanto, deve-se verificar e documentar que o sistema funciona conforme as requerimentos farmacopeicos.

Na qualificação de desempenho, de modo geral, os critérios que precisam ser atendidos por MMR's podem ser divididos em duas categorias: quantitativo e qualitativo.

O capítulo 1225 da Farmacopeia Americana 2013 indica quais critérios devem ser satisfeitos para os testes qualitativos e quais devem ser satisfeitos para os testes quantitativos.

Considerando-se que o teste de esterilidade é um teste qualitativo, por apresentar resultado do tipo passa/falha, considera-se que os parâmetros avaliados na qualificação de desempenho: especificidade, limite de detecção, repetibilidade e equivalência. (Farmacopeia Americana, 2013)

A) Especificidade

A especificidade é a capacidade do método em detectar uma gama de micro-organismos, demonstrando-se adequado ao que se propõe. Devem ser avaliadas as

cepas preconizadas pelos compêndios, pois acredita-se que essas sejam representativas quanto à variabilidade. Adicionalmente, deve-se avaliar cepas que representem potenciais fontes de contaminação do processo, o que pode ser avaliado por meio de compilação de dados históricos de monitoramento ambiental e/ou “*screening*” do processo.

B) Limite de detecção/Sensibilidade

O Limite de detecção ou sensibilidade é o menor número de micro-organismos que pode ser detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificado, sob condições experimentais definidas.

A determinação do limite de detecção na validação do método microbiológico alternativo requer a detecção da menor carga de contaminação possível e, portanto, um inóculo de baixa concentração.

Nesse contexto, deve-se considerar como principal limitação operacional a obtenção do inóculo cujo número de UFC's em baixa quantidade seja obtido com precisão.

Estima-se que a variabilidade envolvida no método de diluição seriada seja de $\pm 0,5$ log para fungos e $\pm 0,3$ log para bactérias. (JENISSON, M; WADSWORTH G, 1939; *EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods*, 2000)

Além disso, se forem coletadas alíquotas de uma solução hipoteticamente homogênea de uma suspensão microbiana, as contagens resultantes dessas alíquotas resultarão em uma distribuição de Poisson. Isso implica que, na medida que o número de UFC em suspensão diminui, diminui a precisão. (JENISSON, M; WADSWORTH G, 1939). Portanto, em baixo nível de contaminação, o método de diluição seriada não permite obter um inóculo de baixíssima carga de contaminação com precisão, o que faz dessa técnica inadequada para o propósito da validação.

Alternativamente, o Bioball® *single shot* (figura 6) é uma esfera branca de aproximadamente 3 mm, que contém 30 UFC, com variação inferior a 2 desvios padrões em número absoluto. Essas esferas são produzidas por citometria de fluxo, onde são contados 30 micro-organismos viáveis, que são depositados em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizados. Trata-se de um processo robusto pois apresenta uma variação inferior a 1 desvio padrão de lote para lote (MORGAN, *et. al.* 2004).



Figura 6 - Frasco contendo Bioball®

C) Robustez

A Robustez é o grau de reprodutibilidade dos resultados do teste sob diferentes condições experimentais como: analistas diferentes, instrumentos diferentes e diferentes lotes de insumos.

D) Equivalência

A equivalência é, essencialmente, a medida de quão similar o método alternativo é com relação ao método farmacopeico.

Conforme preconizado na Farmacopeia Americana, 2013, a equivalência dos critérios pode ser avaliada de forma quantitativa. Recomenda-se a realização de testes Qui-Quadrado para avaliar a proporção de amostras detectadas em ambos os métodos.

Esse teste requer, para cada condição avaliada, um mínimo de 5 amostras, para que seu resultado seja estatisticamente significativo.

A equivalência, por si só, não justifica a substituição do método farmacopeico pelo método alternativo, uma vez que o primeiro dispensa validação por possuir longo e amplo histórico e em sua implementação, deve-se somente proceder à adequação do método ao seu uso pretendido.

A implementação deve ocorrer, somente se, o método alternativo, além de apresentar equivalência quanto aos parâmetros críticos avaliados, apresentar desempenho superior, quanto ao tempo de liberação de resultado, ao custo de aquisição, ao suporte necessário e disponível, ao custo de execução e manutenção de todo o aparato a longo prazo (MOLDENHAUER e SUTTON, 2004).

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é verificar se Bact/Alert® aplicado ao teste de esterilidade de Soluções Parenterais de Grande Volume (SPGV) pode ser validado e considerado como equivalente ao método farmacopeico e se, demonstrada a equivalência, se apresenta tempo de detecção inferior ao método farmacopeico.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. EQUIPAMENTO UTILIZADO

O método microbiológico rápido do presente trabalho – Bact/Alert[®], (Figura 7), foi disponibilizado pela Biomerieux[®].



Figura 7 - Bact/Alert[®] com câmara de incubação aberta.

Conforme mencionado no item 1.7 o equipamento é dotado de um sistema de detecção e processamento que inclui algoritmos de detecção de crescimento microbiano em diferentes etapas. No presente trabalho o algoritmo utilizado, foi o algoritmo padrão do equipamento.

3.2. MICRO-ORGANISMOS TESTE

Foram utilizados BioBalls[®] *single shot* (Biomerieux[®]), dos seguintes micro-organismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Tabela 1 - Características dos micro-organismos testados

Micro-organismo	Preferência Metabólica	Classificação
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	Aeróbico/ Anaeróbico facultativo	Bactéria Gran positiva
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	Aeróbico/ Anaeróbico facultativo	Bactéria Gran positiva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	Aeróbico/ Anaeróbico facultativo	Bactéria Gran negativa
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	Aeróbico/ Anaeróbico facultativo	Bactéria Gran negativa
<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 19404)	Anaeróbico obrigatório	Bactéria Gran positiva
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	Aeróbico obrigatório	Fungo - Levedura (*)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404)	Aeróbico obrigatório	Fungo - Bolor (*)

(*)Fungos são Gran positivos
(MURRAY, *et. al.*, 1998)

3.3. INSTALAÇÕES E INSTRUMENTOS

A execução dos experimentos foi realizada em dois laboratórios diferentes, sendo eles o Laboratório de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo e o Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Farmácia (FBF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF – USP).

No Laboratório de Bromatologia e Química do IAL foi realizada a etapa de inoculação das amostras intencionalmente contaminadas, pré incubação e coleta de alíquotas e inoculação das amostras nos frascos de BCTA, enquanto que, no

Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Farmácia (FBF) da FCF – USP foi realizada a incubação dos frascos inoculados no equipamento BCTA.

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 / n° 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.

Todo material envolvido no teste: meios de cultura, solução de lavagem, dispositivos de transferência de amostras, tesouras e pinças, etc. foram testados quanto à esterilidade, evitando a ocorrência de falsos-positivos.

3.4. TRANSPORTE DOS FRASCOS DE BACT/ALERT® CONTENDO INÓCULO

Os frascos de BCTA contendo os inóculos foram transportados em caixas de isopor contendo gelo até o Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Farmácia (FBF) da FCF-USP. Tal procedimento foi realizado em até no máximo 4h após o processo de inoculação.

3.5. COLETA DE INÓCULO DOS TUBOS CONTENDO CALDO CASEÍNA SOJE E CALDO TIOGLICOLATO.

A coleta das alíquotas dos tubos contendo meio de cultura caseína soja e meio tioglicolato foram feitas utilizando-se seringas de 10 mL e agulhas estéreis de (Beckton Dickinson Company).

Nos experimentos realizados com *C. sporogenes* foi utilizado na coleta de amostras, escalpe para coleta de amostras à vácuo, conforme figura 8.



**Figura 8 - Escalpe para coleta de amostras à vácuo BD
Vacutainer Brand Blood Collection sets®
(Beckton Dickinson Company)**

3.6. MEIOS DE CULTURA E PRODUTOS

Para a realização dos testes foram utilizados solução salina, concentrado polieletrólítico para diálise e solução de metronidazol, todos estéreis, como produtos.

Os tubos de ensaio utilizados para armazenamento do meio de cultura tinham a dimensão de (25x150) mm.

3.6.1. Meios de Cultura

a) **Meio fluido de tioglicolato**

- L-Cistina 0,5 g;
- Cloreto de sódio 2,5 g;
- Dextrose 5,5 g;
- Ágar granulado (umidade não superior a 15%) 0,75 g;
- Extrato de levedura (solúvel em água) 5,0 g;
- Caseína obtida por digestão pancreática 15,0 g;
- Tioglicolato de sódio (ou ácido tioglicólico) 0,5 g (0,3 mL);
- Resazurina sódica a 0,1% (p/v) recentemente preparada 1,0 mL; e
- Água purificada 1000 mL.

O pH do meio após esterilização é de $7,1 \pm 0,2$

b) **Caldo de Caseína soja**

- Caseína de digestão pancreática 17,0 g;
- Farinha de soja de digestão papaínica 3,0 g;
- Cloreto de sódio 5,0 g;
- Fosfato de potássio dibásico 2,5 g;
- Dextrose 2,5 g; e
- Água purificada 1000 mL.

O pH do meio após esterilização é de $7,3 \pm 0,2$.

c) **Meio BacT/ALERT® SA Biomerieux® - Meio aeróbico**

- Digerido pancreático de Caseína 1,7% p/v;
- Digerido de papaína de farelo de soja 0,3% p/v;
- Polianetosulfonato de sódio (SPS) 0,035%;
- Hidroclorato de Piridoxina 0,001% p/v;
- Outros substratos de aminoácidos e carboidratos complexos; e
- Água destilada q.s.p. 40 mL.

O pH varia de 7,03 a 7,52. Os frascos são preparados com atmosfera de CO₂ em oxigênio à vácuo.



Figura 9 - Frasco SA®, utilizado no equipamento Bact/Alert®.

d) Meio BacT/ALERT® SN Biomerieux® - Meio Anaeróbico

- Digerido pancreático de caseína 1,36% p/v;
- Digerido de papaína de farelo de soja 0,24% p/v;
- Polianetosulfonado de Sódio 0,035% p/v (SPS) – anticoagulante;
- Menadiona 0,00005% p/v;
- Hemina 0,00005% p/v;
- Extrato de levedura 0,376% p/v;
- Hidroclorato de Piridoxina 0,000,8% p/v;
- Piruvato de Sódio 0,08% p/v;
- Agentes redutores e outros aminoácidos e carboidratos complexos; e
- Água q.s.p. 40mL.

O pH varia de 7,14 a 7,4 . Os frascos são preparados com atmosfera de CO₂ em nitrogênio sob vácuo.



Figura 10 - Frasco SN®, utilizado no equipamento Bact/Alert®.

3.6.2. Produtos

a) Solução de Metronidazol 500mg - Metroniflex[®] - BAXTER[®]

- Água purificada q.s.p. 100mL.
O pH é de 5,5 (4,7 – 7) e a osmolaridade 310 mOsmol/L.

b) Solução fisiológica apirogênica[®] BAXTER[®]

- Cloreto de sódio a 0,9%; e
- Água q.s.p. 100mL.
O pH é de aproximadamente 5,0.

c) Concentrado polieletrólítico para diálise Dianeal[®] BAXTER

- Volume 6L.
 - Cada 100mL contém:
 - Glicose monoidratada: 4,25g;
 - Cloreto de sódio: 538mg;
 - Cloreto de Cálcio dihidratado: 18,3mg;
 - Cloreto de Magnésio hexahidratado: 5,06mg;
 - Lactado de sódio: 448mg; e
 - Água para injetáveis: q.s.p. 100mL.
- O pH é de 5,2 (4 – 6,5) e a osmolaridade de 483 mOsmol/L.

3.7. MONITORAMENTO AMBIENTAL

A preparação dos inóculos e a execução dos testes foram realizadas em unidade de fluxo de ar unidirecional. O monitoramento microbiológico foi feito passivamente por meio de distribuição de placas de sedimentação contendo Ágar caseína de soja na unidade de fluxo de ar unidirecional e em pontos específicos onde foi realizado o ensaio, com tempo de exposição de 30 min. A incubação dessas placas foi feita em estufa a 20-25°C por 5 dias e em seguida a 30-35°C por mais 2 dias.

3.8. CONTROLE DE BIOBALLS® SINGLESHOT

Os Bioballs® são disponibilizados pelo fabricante em um frasco hermeticamente fechado e uma ampola com o fluido de reidratação. Cada frasco contém apenas um *Bioball* e o processo de reidratação se dá pela aplicação do fluido de reidratação sobre o *Bioball*, que dissolve instantaneamente.

Antes do início de cada experimento, um BioBall® *SingleShot*, foi plaqueado em placa de Petri contendo ágar caseína de soja inclinado, incubado a 30-35°C por 24 a 48 horas, no caso de bactérias, e em Ágar Saboraud a 20- 25°C, por 7 dias, no caso de bolores e leveduras. Essa medida se fez necessária para confirmar a carga microbiana estabelecida pelo fabricante, de 28 a 33 UFC/ BioBalls® (Farmacopeia Brasileira 2010.; Farmacopeia Americana, 2013).

3.9. FASES EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO

Foram utilizados três níveis de concentração de padrões microbianos: N1 (20 UFC/teste), N2 (2 UFC/teste) e N3 (0,2 UFC/teste) (Farmacopeia Americana, 2013; *EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods*, 2000). O número de amostras utilizadas nos experimentos está descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Número de réplicas utilizadas nas fases do experimento

Carga de Contaminação	Solução Salina	Concentrado polieletrólítico para diálise	Solução de Metronidazol
20 UFC/teste	3	3	3
2 UFC/teste	24	12	12
0,2 UFC/teste	24	12	12

O inóculo foi preparado pela dissolução de número adequado de BioBalls® *SingleShot* em solução salina para obter cada um dos níveis de contaminação (VERDONK *et. al.* 2010).

3.10. MÉTODO FARMACOPEICO – AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO

A contaminação das amostras dos produtos (solução salina; concentrado polieletrolítico para diálise e solução de metronidazol) foi realizada em 4 etapas:

I. Filtrou-se 100mL do produto testado (solução salina; concentrado polieletrolítico para diálise ou solução de metronidazol).;

II. Consecutivamente, filtrou-se 2 vezes 100mL de solução Salina,

III. Reidratou-se os Bioballs® com o kit fornecido pelo fabricante, inoculou-se quantidade de Bioball reidratado em 100mL de solução salina a fim de se obter as cargas de contaminação desejadas (20UFC; 2UFC; 0,2UFC) diluiu-se até atingir a carga adequada; e

IV. Filtrou-se os 100mL solução salina intencionalmente contaminada com as cargas de contaminação desejadas.

Nos testes realizados com *C. sporogenes* e Metronidazol foi realizada uma lavagem a mais de solução salina. A justificativa dessa alteração de metodologia especificamente para esse micro-organismo está descrita no item 6.2.2.

Após a filtração, a membrana filtrante foi seccionada na metade, sendo que cada metade transferida para 90 mL de meio de cultura – caldo Caseína de soja (TSB) e meio fluido de Tioglicolato com indicador (TIO) – que foram incubados nas condições de temperatura preconizadas pelo método, conforme tabela 3:

Tabela 3 - Condições de incubação de cada cepa microbiana

Micro-organismo	Meio de Cultura	Temperatura de Incubação
<i>Escherichia coli</i>	caldo caseína soja (TSB)	32,5±0,5°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	caldo caseína soja (TSB)	32,5±0,5°C
<i>Bacillus subtilis</i>	caldo caseína soja (TSB)	32,5±0,5°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	caldo caseína soja (TSB)	32,5±0,5°C
<i>Clostridium sporogenes</i>	caldo tioglicolato (TIO)	32,5±0,5°C
<i>Candida albicans</i>	caldo caseína soja (TSB)	22,5±0,5°C
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	caldo caseína soja (TSB)	22,5±0,5°C

Nos testes realizados com *A.brasiliensis* as membranas filtrantes foram inoculadas em 20mL de meio de cultura, a fim de facilitar a coleta do microrganismo na inoculação dos frascos de Bact/Alert®, tanto para as amostras quanto para os controles. A justificativa dessa alteração de metodologia estão descritas no item 6.2.2.

- a) **Controle negativo:** 90 mL de cada meio de cultura – caldo caseína soja (TSB) e meio fluido de tioglicolato com indicador (TIO), foram incubados, sem nenhum inóculo microbiano, nas condições conforme tabela 3.
- b) **Controle negativo do produto:** 100 mL do produto foram submetidos ao teste de esterilidade convencional, pelo método de filtração por membrana. Após filtração da amostra, a membrana foi lavada com duas porções de solução salina e seccionada, sendo que cada metade transferida para 90 mL de meio de cultura – caldo caseína soja (TSB) e caldo tioglicolato com indicador (TIO), os quais foram incubados nas condições de temperatura conforme tabela 1.

- c) **Controle positivo:** O volume resultante da reidratação de 1 Bioball® foi transferida para 90 mL de meio de cultura – caldo Caseína de soja (TSB) e caldo tioglicolato com indicador (TIO), os quais foram incubados nas condições de temperatura conforme tabela 3.

Após 18h de incubação, foram retiradas alíquotas de cada meio de cultura dos testes e controles, para serem avaliadas por BCTA. Após cada retirada de alíquotas, os meios de cultura retornaram às condições de temperatura de incubação, sendo mantidos por 28 dias até o resultado final do teste de esterilidade convencional.

3.11. MÉTODO RÁPIDO – BACT/ALERT®

As alíquotas foram retiradas somente das amostras de meio de preferência metabólica do micro-organismo testado, ou seja, quando testados micro-organismos aeróbicos (6 cepas), as alíquotas foram retiradas de caldo Caseína de soja e quando anaeróbico (1 cepa), de caldo Tioglicolato.

Previamente à coleta das alíquotas, os tubos contendo caldo Caseína de soja foram vigorosamente agitados em vortex a 2.200 rpm durante 30s. Os tubos contendo meio fluido tioglicolato foram suavemente agitados a fim de não expor o micro-organismo presente ao oxigênio do ar.

A coleta das alíquotas foi feita por meio de seringas estéreis descartáveis, com exceção de *C.sporogenes*, em que a coleta foi realizada através de escalpe (BD VACUTAINER Brand blood collection® sets). O escalpe foi imerso próximo ao fundo do tubo, bem abaixo do anel formado pela resazurina. A inoculação foi realizada transferindo-se 5mL das alíquotas retiradas dos testes convencionais sendo alíquotas referentes ao caldo Caseína-soja inoculadas em frascos SA®

aeróbicos, e alíquotas referentes ao caldo tioglicolato inoculados em frascos SN[®] anaeróbicos e incubados a $32,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ no equipamento. Após a incubação o equipamento realizou a leitura das amostras a cada 10 min. durante 14 dias.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Todas as análises estatísticas descritas a seguir foram realizadas utilizando-se o software estatístico Minitab[®] v.16. Todos os testes de inferência estatística tiveram como base coeficiente de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

Os testes com o método rápido foram feitos em paralelo com o método farmacopeico, o que é de fundamental importância para esse trabalho, para que os dados tenham significado estatístico.

4.1. QUALIFICAÇÃO DE INSTALAÇÃO

Tanto a qualificação de instalação, quanto a qualificação de operação, foram realizadas em conjunto com fabricante do equipamento.

Na qualificação de instalação foram verificadas a estabilidade da alimentação elétrica; a instalação de “*No-break*” e a adequação da temperatura ambiente da sala.

Os itens verificados apresentaram resultados satisfatórios.

4.2. QUALIFICAÇÃO DE OPERAÇÃO

Foi realizada calibração do equipamento pelo fabricante antes da realização dos experimentos, onde foram verificados, o funcionamento do software (sistemas de senhas, funcionamento de alarmes, registro de dados e backup, exportação de dados, sistema de detecção das amostras, registro de entrada e saída de amostras, controle de temperatura nas câmaras incubadoras. Todos esses itens foram testados e apresentaram resultados em conformidade com as especificações fornecidas pelo fabricante do equipamento.

Além disso, foi realizada a “Prova de Conceito” cujo propósito foi avaliação do potencial do método rápido em ser validado frente ao MFCP, ou seja, determinar nesse caso, se a qualificação de performance é factível. Os resultados dessa etapa estão disponíveis na tabela 4.

4.3. QUALIFICAÇÃO DE DESEMPENHO

A qualificação de desempenho foi realizada conforme critérios definidos no item 1.8.1.3. Os resultados dos testes referentes à Qualificação de desempenho estão sumarizados nas tabelas 5 e 6.

Tabela 4 - Resultados da qualificação de operação (Prova de Conceito) – Carga de contaminação - 20UFC/teste

Micro-organismo	Tipo de produto	MFCP			BCTA		
		Média Δt (h)	S	Falsos negativos/ Total de testes	Média Δt (h)	S	Falsos negativos/ Total de testes
<i>E.coli</i>	Solução salina	48 ± 0		0/3	23 ± 1		0/3
	Concentrado polieletrólítico	48 ± 0		0/3	23 ± 0		0/3
	Solução de Metronidazol	48 ± 0		0/3	23 ± 0		0/3
<i>B.subtilis</i>	Solução salina	48 ± 0		0/3	28 ± 1		0/3
	Concentrado polieletrólítico	48 ± 0		0/3	27 ± 1		0/3
	Solução de Metronidazol	48 ± 0		0/3	29 ± 1		1/3
<i>S.aureus</i>	Solução salina	48 ± 0		0/3	29 ± 0		0/3
	Concentrado polieletrólítico	48 ± 0		0/3	30 ± 0		0/3
	Solução de Metronidazol	48 ± 0		0/3	29 ± 0		0/3
<i>P.aeruginosa</i>	Solução salina	48 ± 0		0/3	28 ± 0		0/3
	Concentrado polieletrólítico	48 ± 0		0/3	30 ± 0		0/3
	Solução de Metronidazol	48 ± 0		0/3	29 ± 1		0/3
<i>C.sporogenes</i>	Solução salina	48 ± 0		0/3	52 ± 14		0/3
	Concentrado polieletrólítico	48 ± 0		1/3	35 ± 6		1/3
	Solução de Metronidazol	48 ± 0		0/3	29 ± 6		0/3
<i>A. brasiliensis</i>	Solução salina	72 ± 0		0/3	120 ± 17		0/3
	Concentrado polieletrólítico	72 ± 0		0/3	119 ± 22		0/3
	Solução de Metronidazol	72 ± 0		0/3	106 ± 27		0/3
<i>C.albicans</i>	Solução salina	72 ± 0		0/3	39 ± 2		0/3
	Concentrado polieletrólítico	72 ± 0		0/3	37 ± 0		0/3
	Solução de Metronidazol	72 ± 0		0/3	41 ± 3		0/3

Δt (h) – variação de tempo

S – Desvio padrão amostral

Tabela 5 - Resultados da qualificação de desempenho – Carga de contaminação - 2 UFC/teste

Micro-organismo	Tipo de produto	MFCP			BCTA		
		Média Δt (h)	S	Falsos negativos/ Total de testes	Média Δt (h)	S	Falsos negativos/ Total de testes
<i>E.coli</i>	Solução salina	48 ± 0		7/24	23 ± 1		8/24
	Concentrado polieletrólítico	48 ± 0		3/12	24 ± 2		4/12
	Solução de Metronidazol	50 ± 7		1/12	24 ± 0		2/12
<i>B.subtilis</i>	Solução salina	48 ± 0		10/24	27 ± 1		10/24
	Concentrado polieletrólítico	48 ± 0		2/12	27 ± 2		6/12
	Solução de Metronidazol	51 ± 8		4/12	26 ± 1		2/12
<i>S.aureus</i>	Solução salina	74 ± 7		11/24	29 ± 1		12/24
	Concentrado polieletrólítico	72 ± 0		7/12	26 ± 0		7/12
	Solução de Metronidazol	77 ± 10		2/12	27 ± 1		3/12
<i>P.aeruginosa</i>	Solução salina	48 ± 0		7/24	33 ± 0		7/24
	Concentrado polieletrólítico	52 ± 10		6/12	33 ± 2		6/12
	Solução de Metronidazol	48 ± 0		2/12	32 ± 1		2/12
<i>C.sporogenes</i>	Solução salina	87 ± 25		16/24	86 ± 70		13/24
	Concentrado polieletrólítico	96 ± 0		11/12	231 ± 40		10/12
	Solução de Metronidazol	96 ± 0		9/12	128 ± 0		11/12
<i>A. brasiliensis</i>	Solução salina	98 ± 6		9/24	66 ± 27		21/24
	Concentrado polieletrólítico	96 ± 0		4/12	85 ± 0		11/12
	Solução de Metronidazol	96 ± 0		4/12	42 ± 0		11/12
<i>C.albicans</i>	Solução salina	48 ± 0		5/24	42 ± 10		9/24
	Concentrado polieletrólítico	48 ± 0		1/12	43 ± 1		10/12
	Solução de Metronidazol	48 ± 0		6/12	34 ± 15		10/12

Δt (h) – variação de tempo

S – Desvio padrão amostral

Tabela 6 - Resultados da Qualificação de desempenho – Carga de contaminação – 0,2 UFC/teste

Micro-organismo	Tipo de produto	MFCP			BCTA		
		Média Δt (h)	S	Falsos negativos/ Total de testes	Média Δt (h)	S	Falsos negativos/ Total de testes
<i>E.coli</i>	Solução salina	72 \pm 54		19/24	45 \pm 41		19/24
	Concentrado polieletrólítico	48 \pm 0		10/12	26 \pm 0		10/12
	Solução de Metronidazol	48 \pm 0		10/12	32 \pm 10		9/12
<i>B.subtilis</i>	Solução salina	36 \pm 24		19/24	52 \pm 49		19/24
	Concentrado polieletrólítico	48 \pm 0		11/12	31 \pm 7		8/12
	Solução de Metronidazol	48 \pm 0		11/12	27 \pm 0		11/12
<i>S.aureus</i>	Solução salina	48 \pm 0		21/24	29 \pm 0		22/24
	Concentrado polieletrólítico	48 \pm 0		9/12	29 \pm 1		9/12
	Solução de Metronidazol	0 \pm 0		0/12	29 \pm 1		9/12
<i>P.aeruginosa</i>	Solução salina	48 \pm 0		20/24	42 \pm 3		21/24
	Concentrado polieletrólítico	48 \pm 0		10/12	43 \pm 0		10/12
	Solução de Metronidazol	48 \pm 0		10/12	44 \pm 5		10/12
<i>C.sporogenes</i>	Solução salina	56 \pm 14		21/24	29 \pm 2		21/24
	Concentrado polieletrólítico	48 \pm 0		9/12	29 \pm 1		9/12
	Solução de Metronidazol	72 \pm 0		11/12	31 \pm 0		11/12
<i>A. brasiliensis</i>	Solução salina	96 \pm 0		22/24	53 \pm 27		18/24
	Concentrado polieletrólítico	96 \pm 0		10/12	105 \pm 7		9/12
	Solução de Metronidazol	0 \pm 0		12/12	114 \pm 103		10/12
<i>C.albicans</i>	Solução salina	48 \pm 0		21/24	38 \pm 1		21/24
	Concentrado polieletrólítico	48 \pm 0		9/12	38 \pm 1		8/12
	Solução de Metronidazol	48 \pm 0		11/12	38 \pm 0		11/12

Δt (h) – variação de tempo

S – Desvio padrão amostral

4.4. MONITORAMENTO AMBIENTAL

Tabela 7 - Resultados de Monitoramento Ambiental

Data do experimento	Etapa de inoculação no MFCP	Etapa de inoculação nos frascos de BCTA	Aceitação do experimento
06/12/2011	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
13/12/2011	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
20/12/2011	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
11/01/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
17/01/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
31/01/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
07/02/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
14/02/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
24/02/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
28/02/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
02/03/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
08/03/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
13/03/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
27/03/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
04/04/2012	Presença de Contaminação	Presença de Contaminação	Inválida
11/04/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
17/04/2012	Presença de Contaminação	Presença de Contaminação	Inválida
31/05/2012	Presença de Contaminação	Presença de Contaminação	Inválida
12/06/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
14/08/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
28/08/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
14/09/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
15/09/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
28/09/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida
23/10/2012	Ausência de contaminação	Ausência de contaminação	Válida

4.5. CARGA MICROBIANA DOS LOTES DE BIOBALLS® SINGLE SHOT UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Todos os Resultados dos testes realizados com os Bioballs confirmaram a carga microbiana declarada no certificado de análise do fabricante.

4.6. TESTES ESTATÍSTICOS DE ASSOCIAÇÃO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES TESTADAS

Tabela 8 - Resultados dos testes de associação entre os métodos nos experimentos realizados com 20UFC/teste

Microrganismo	Teste estatístico			Resultado Final
	Pearson (r)	Qui-Quadrado (P-Value)	Teste de Concordância (P-Value)	
<i>Escherichia coli</i>	0	(1,000;1,000)	0,5	Equivalente
<i>Bacillus subtilis</i>	0,0443242	N/A	0,443105	Equivalente
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	(1,000;1,000)	0,5	Equivalente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	(1,000;1,000)	0,5	Equivalente
<i>Clostridium sporogenes</i>	0	(1,000;1,000)	0,5	Equivalente
<i>Candida albicans</i>	0	(1,000;1,000)	0,5	Equivalente
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0	(1,000;1,000)	0,5	Equivalente

Tabela 9 - Resultados dos testes de associação entre os métodos nos experimentos realizados com 2UFC/teste

Microrganismo	Teste estatístico			Resultado Final
	Pearson (r)	Qui-Quadrado (P-Value)	Teste de Concordância (P-Value)	
<i>Escherichia coli</i>	0,0184473	(0,984;0,984)	0,427628	Equivalente
<i>Bacillus subtilis</i>	-0,0182659	(0,810;0,791)	0,555061	Equivalente
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0119124	(0,997;0,997)	0,446082	Equivalente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	(1,000;1,000)	0,5	Equivalente
<i>Clostridium sporogenes</i>	-0,0113938	(0,797;0,788)	0,589906	Equivalente
<i>Candida albicans</i>	0,097529	(0,003;0,001)	0,169644	Equivalente
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	0,156774	(0,000;0,000)	0,04274	Não Equivalente

Tabela 10 -Resultados dos testes de associação entre os métodos nos experimentos realizados com 0,2UFC/teste

Microrganismo	Teste estatístico			Resultado Final
	Pearson (r)	Qui-Quadrado (P-Value)	Teste de Concordância (P-Value)	
<i>Escherichia coli</i>	-0,0060537	(0,998;0,998)	0,518377	Equivalente
<i>Bacillus subtilis</i>	-0,0182659	(0,810;0,791)	0,555061	Equivalente
<i>Staphylococcus aureus</i>	-0,0513369	(0,012;0,002)	0,627925	Equivalente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	(1,000;1,000)	0,5	Equivalente
<i>Clostridium sporogenes</i>	0,0061697	(0,999;0,999)	0,462956	Equivalente
<i>Candida albicans</i>	-0,0100733	(0,987;0,987)	0,53823	Equivalente
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-0,0431877	(0,436;0,336)	0,695118	Equivalente

4.7. LIMITES DE DETECÇÃO

Tabela 11. Resultado final dos testes de associação entre os métodos nos experimentos

Teste estatístico				Resultado Final
Pearson (r)	Spearman (rho)	Qui-Quadrado (P-Value)	Teste de Concordância (P-Value)	
0,011288	0,012861	(0,644;0,643)	0,305396	Equivalente

4.8. TEMPOS DE DETECÇÃO

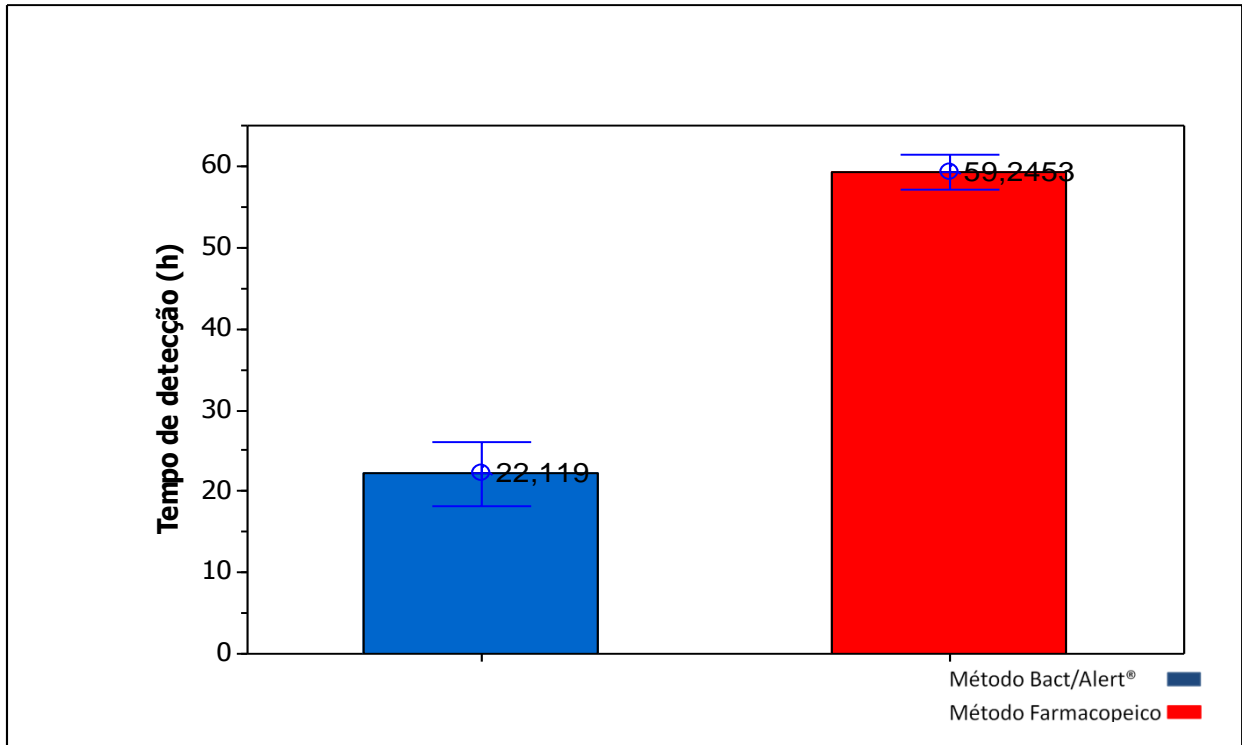


Figura 11 - Comparação de tempos de detecção médios segundo método de detecção.

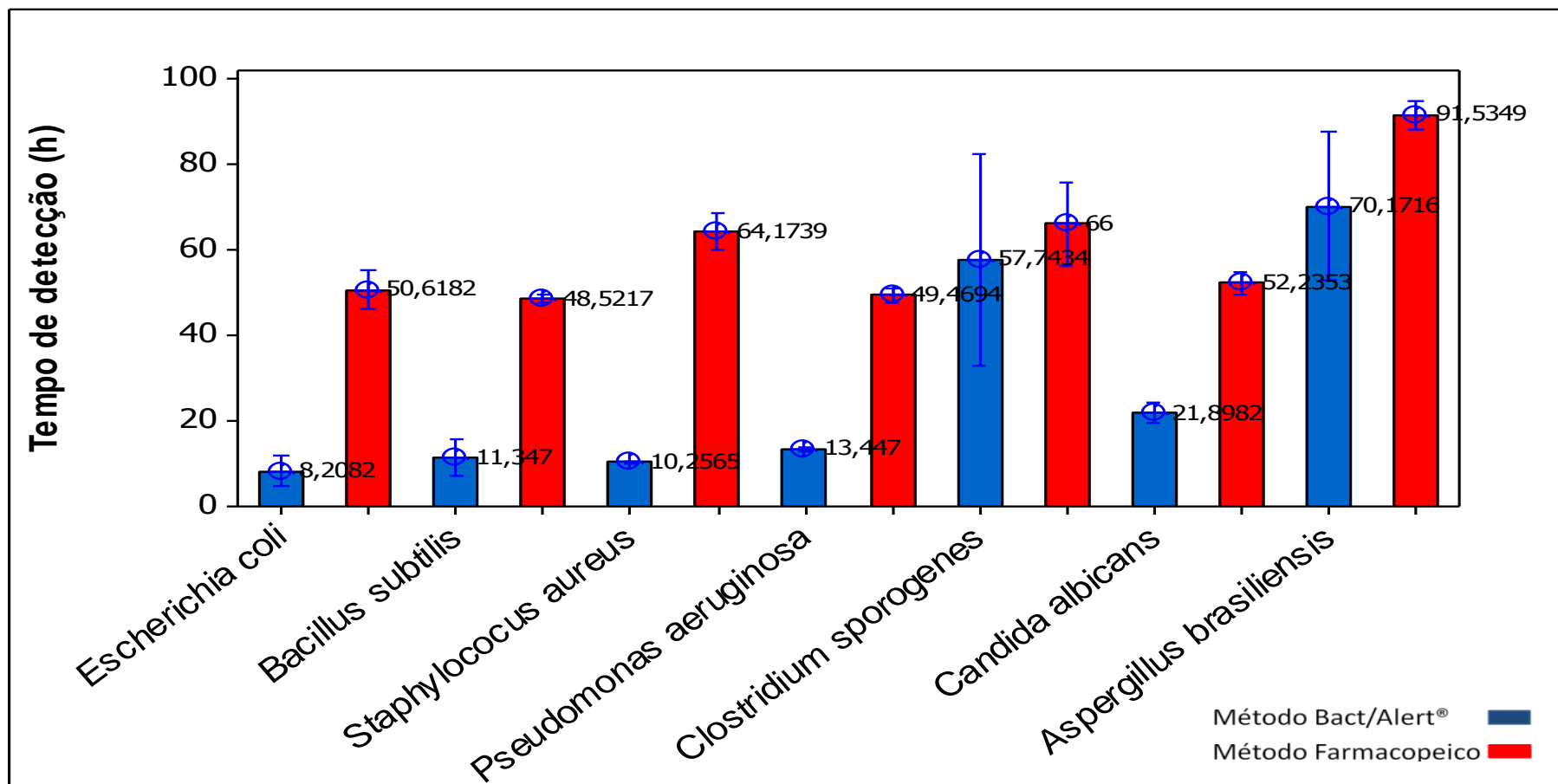


Figura 12 - Comparação de tempos de detecção médios segundo método de detecção e cepa microbiana.

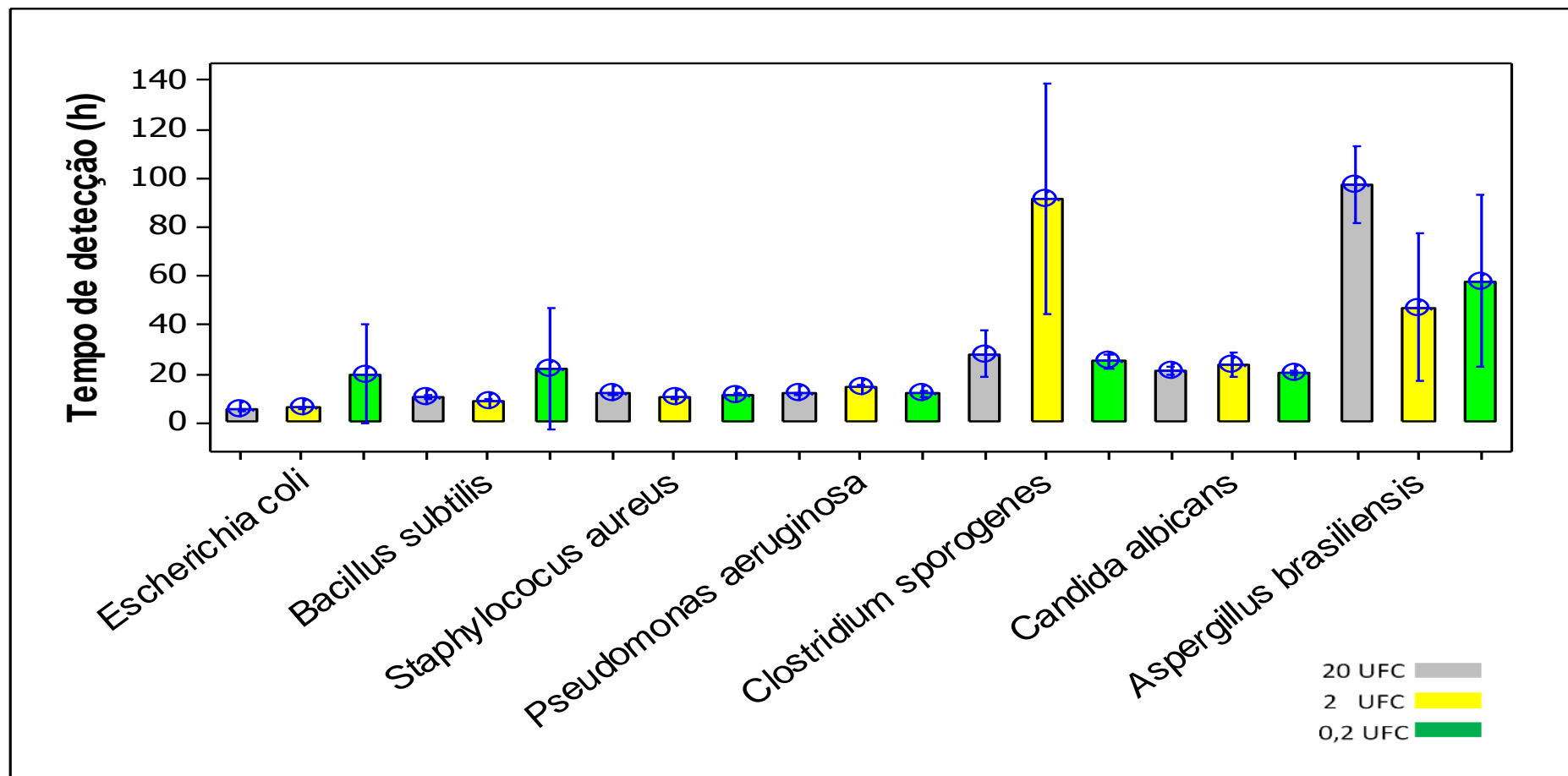


Figura 13 - Tempos de detecção médios no método Bact/Alert® segundo cepa microbiana e carga de contaminação.

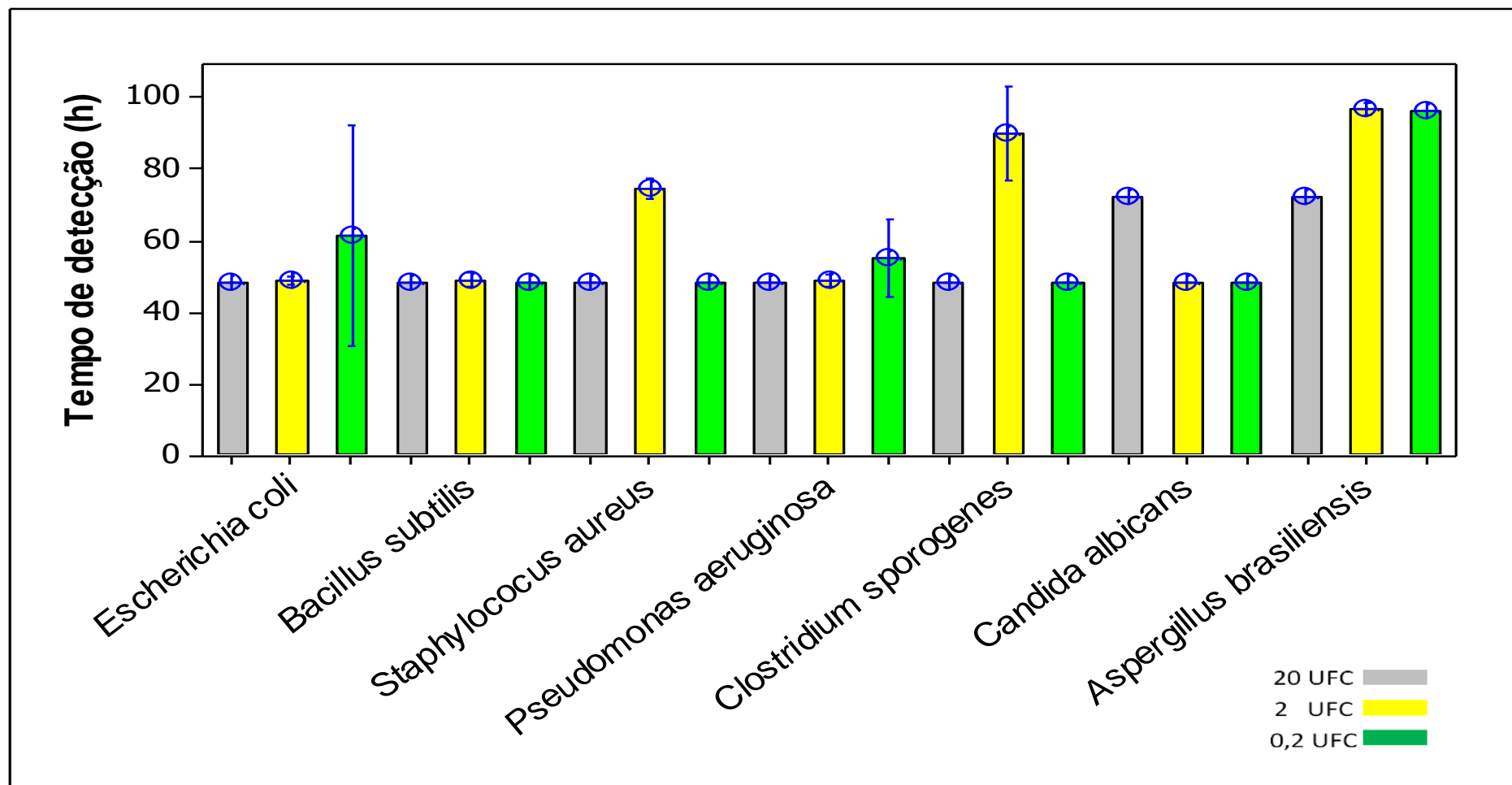


Figura 14 - Tempos de detecção médios no Método Farmacopeico segundo cepa microbiana e carga de contaminação.

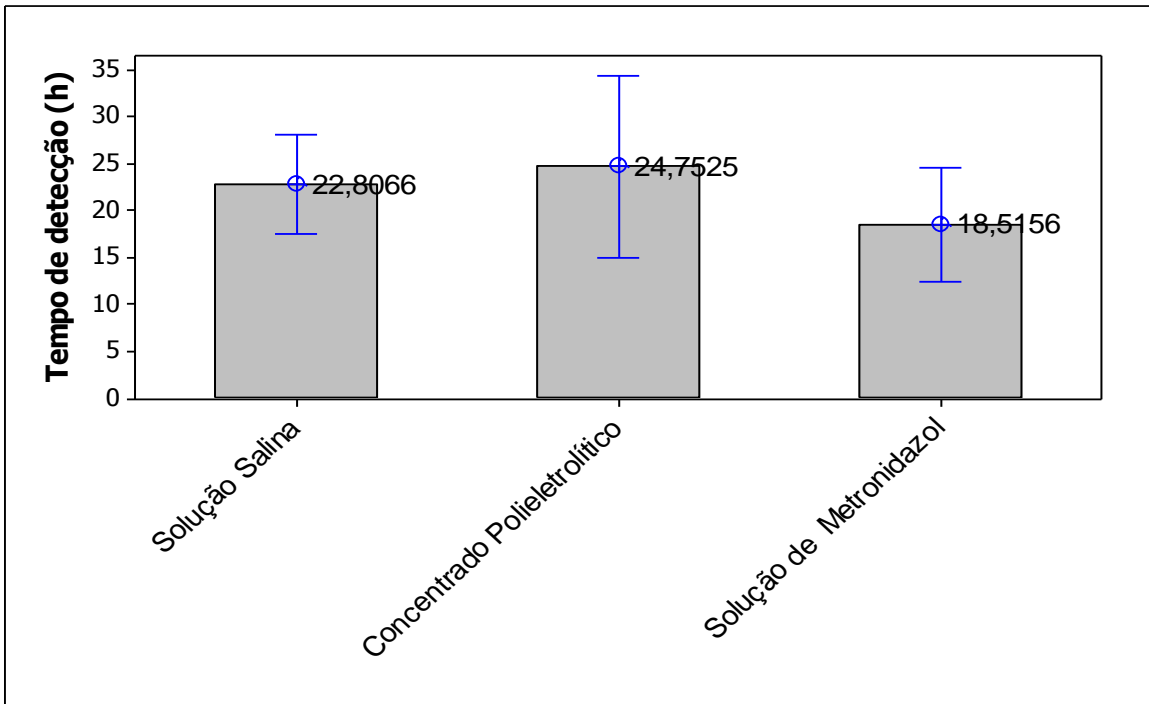


Figura 14 - Tempos de detecção médios no método Bact/Alert® segundo produto.

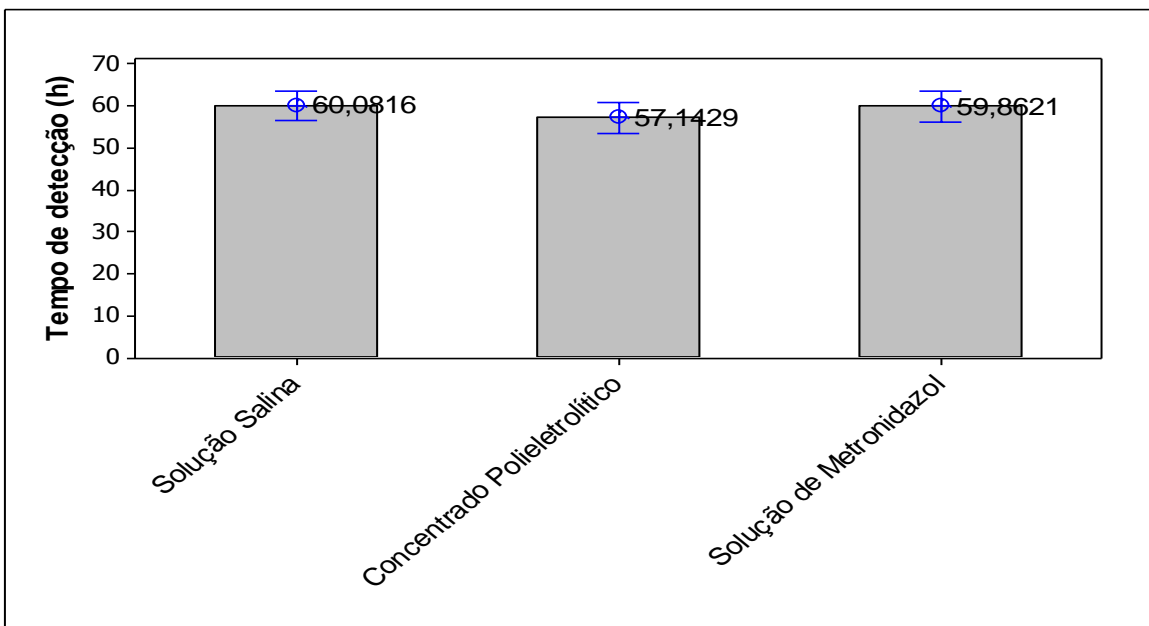


Figura 15 - Tempos de detecção médios no Método Farmacopeico segundo produto.

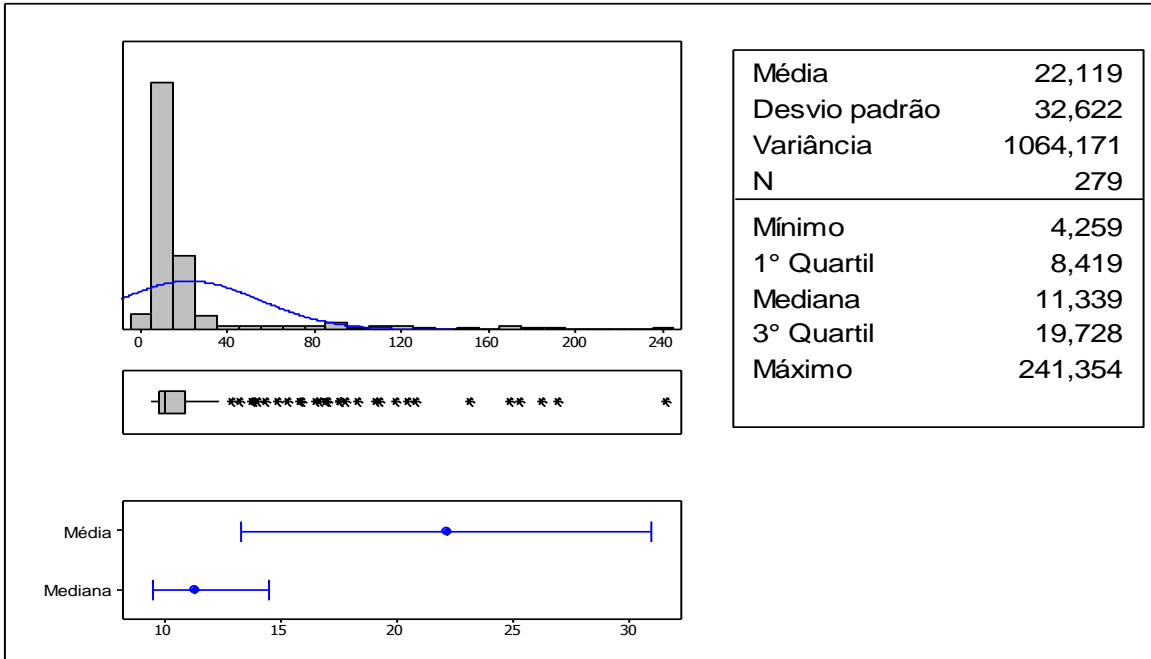


Figura 16 - Estatística descritiva do tempo de detecção no método Bact/Alert®.

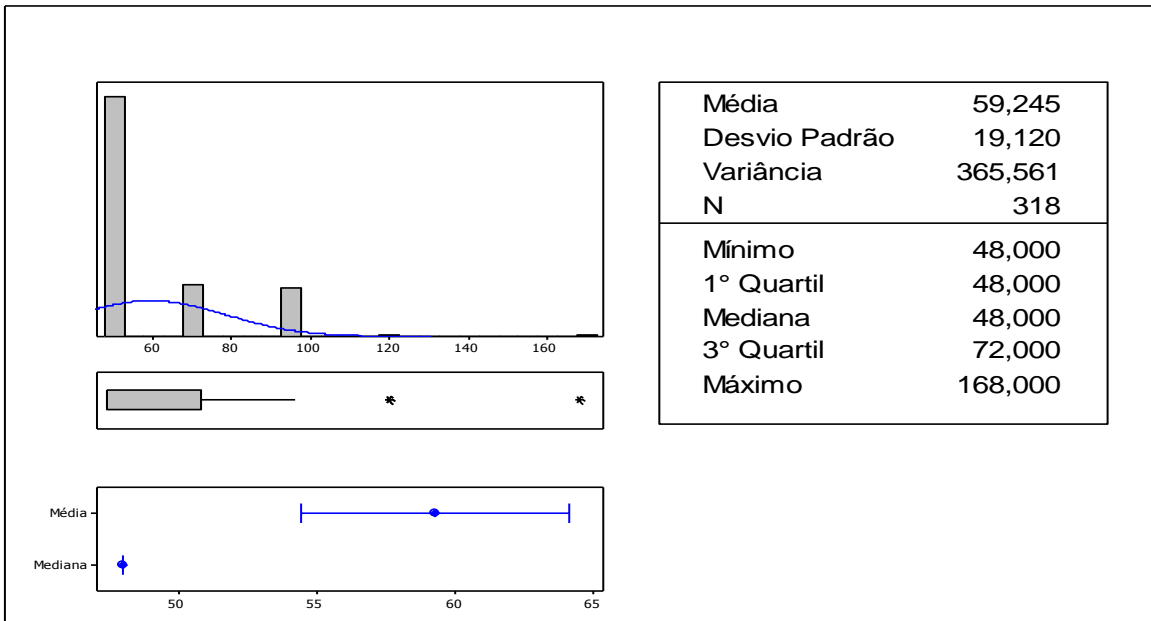
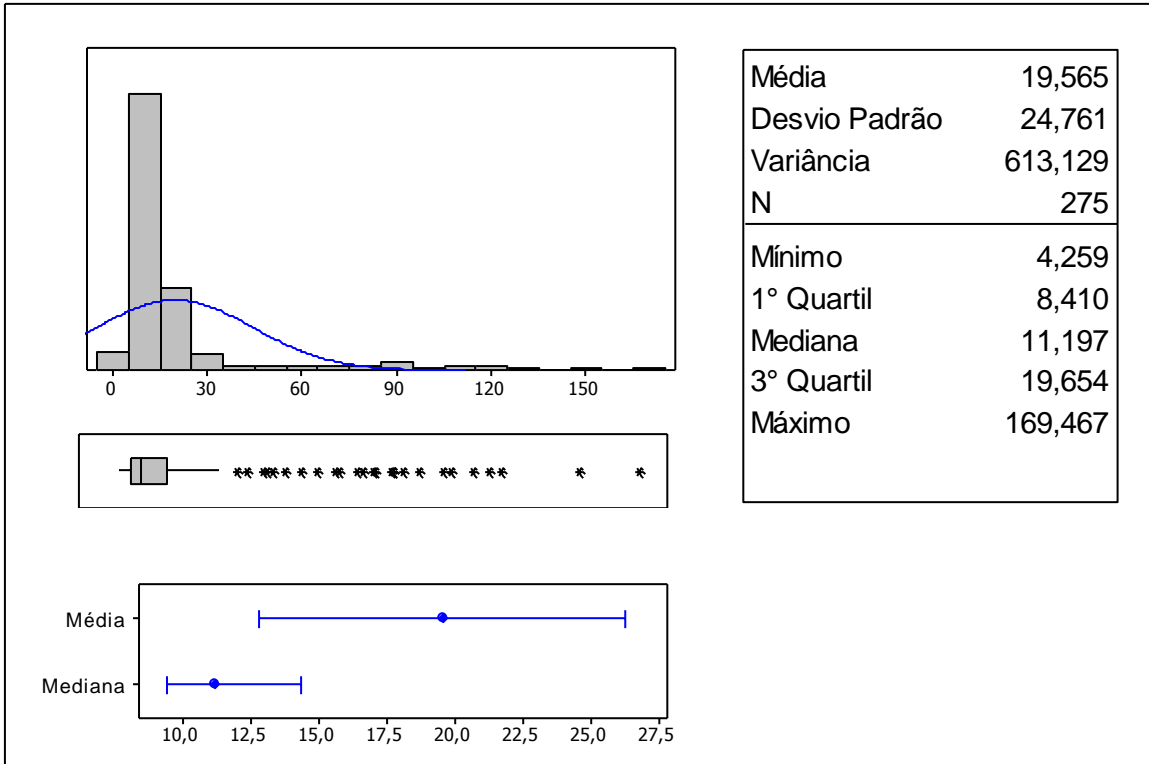


Figura 17 - Estatística descritiva do tempo de detecção no Método Farmacopeico.



**Figura 18 -Estatística descritiva do tempo de detecção
no método Bact/Alert® sem resultados
atípicos.**

O Método Farmacopeico não apresentou resultados atípicos quanto ao tempo de detecção.

5. DISCUSSÃO

5.1. QUALIFICAÇÃO DE INSTALAÇÃO

Nas fases de Qualificação de Instalação e Operação, foi avaliado que BCTA ocupa relativamente pouco espaço, tem consumo elétrico semelhante às estufas de incubação de MFCP. O equipamento de BCTA requereu quase nenhum investimento de infraestrutura para instalação: apenas o “*No break*” fornecido pelo fabricante do equipamento e um sistema de ar-condicionado que já fazia parte da infra-estrutura do laboratório.

5.2. QUALIFICAÇÃO DE OPERAÇÃO

5.2.1. Funcionamento do Equipamento

A calibração do sistema de detecção e do controle de temperatura, não apresentaram complexidade. As funcionalidades do software como controle de senhas, sistema de alarmes, registro e exportação de dados são simples, possuem interface de fácil operação. O equipamento Bact/Alert® possui somente uma estufa de incubação sendo possível portanto, definir uma única temperatura de incubação.

5.2.2. Prova de Conceito

As amostras com alta carga de contaminação puderam ser detectadas em ambos os métodos, conforme tabela 4.

Essa etapa tem alta carga de contaminação e seu principal objetivo é verificar se o método rápido tem a capacidade de detectar as diferentes cepas testadas e se é capaz de detectar altas cargas de contaminação. Portanto, o objetivo dessa etapa não é desafiar o método rápido, mas sim determinar se o método, pode ser validado.

O número de réplicas nas cargas de contaminação de 2 UFC/teste e 0,2UFC/teste foi definido com base nos requerimentos de testes estatísticos. O teste Qui-quadrado requer um mínimo de 5 réplicas para cada condição testada para apresentar representatividade estatística.

Apesar de o propósito da primeira fase ser essencialmente avaliar a validade das condições experimentais e a equivalência de detecção entre os métodos, foi possível verificar que os resultados de tempo de detecção apresentados em BCTA foram inferiores aos resultados apresentados pelo MFCP.

Os dados da literatura evidenciam que a coerência entre o método rápido e o MFCP se mantém mesmo quando a carga de contaminação é diminuída (MASTRONARDI *et. al.*, 2010; VERDONK *et. al.*, 2010; PARVEEN *et. al.*, 2011, KIELPINSKI *et. al.*, 2005).

A adequação na fase de maior carga de contaminação foi essencial para identificar pontos de melhoria, adequar o protocolo experimental e prosseguir para a etapa de avaliação de desempenho em cargas de contaminação inferiores.

Ao final da execução dos experimentos da fase de qualificação de operação, os dados dos experimentos da Prova de Conceito foram analisados quanto:

- à recuperação microbiana, nos dois métodos; e
- à executabilidade dos dados experimentais, sendo identificado que o protocolo experimental poderia ser melhorado.

5.2.3. Tratamento dos dados experimentais.

Os testes estatísticos realizados no decorrer das etapas experimentais foram os testes de equivalência da relação positivos/falsos-negativos entre os dois métodos utilizados (Farmacopeico e Bact/Alert®) e entre os diferentes produtos utilizados (solução salina, concentrado polieletrólítico para diálise, solução de Metronidazol), pois essa avaliação é premissa para avaliação dos tempos de detecção das amostras intencionalmente contaminadas. Os testes estatísticos de equivalência utilizados foram:

- A) Teste qui-quadrado:** verifica associação entre as variáveis, sendo hipótese nula a não-associação entre as variáveis. Portanto, “p” > 0,05 significa que não há associação entre as variáveis e que os métodos são equivalentes;
- B) Teste de correlação de Pearson:** verifica correlação entre as variáveis, sendo nenhuma correlação = 0 e total correlação = ± 1 . Quanto mais próximo de 0 maior a probabilidade de as variáveis serem independentes, de não haver correlação, ou seja, de haver equivalência entre os métodos;
- C) Teste de concordância:** avaliação global sobre a associação entre as variáveis estudadas. A hipótese nula do teste de concordância é que a probabilidade de concordância é igual a probabilidade de discordância. Portanto “p” >0,05 significa que os pares são concordantes e, dessa forma, os métodos são equivalentes.

5.2.4. Adequação do Protocolo Experimental

Durante a execução dos experimentos na prova de conceito foi possível identificar que *C. sporogenes* não apresentou recuperação em ambos os métodos quando inoculado em solução de Metronidazol e *A. brasiliensis* apresentou baixa taxa de recuperação em Bact/Alert® em todos os produtos testados. Por não apresentarem recuperação equivalentes entre os métodos, tanto *C. sporogenes* quanto *A. brasiliensis* tiveram seus protocolos experimentais revisados.

A) *Clostridium sporogenes*

Considerando que as demais condições experimentais foram as mesmas para as outras cepas que tiveram recuperação de 100%, foi possível concluir que a solução de metronidazol estava exercendo efeito bacteriosático.

O metronidazol (5-nitro-imidazol) foi introduzido em 1959 para tratamento de infecções causadas por *Trichomonas vaginalis*. Tem potente atividade anaerobicida, seu espectro de atividade inclui protozoários, bactérias anaeróbicas e algumas poucas microaerófilas (não é ativo frente ao gênero *Actinomyces*), sendo muito ativo frente a bacilos gram-negativos, com raras exceções. Sua ação antibacteriana e antiprotozoária se dá pela desestruturação do DNA. (VICENTE D; TRALLERO P. 2010)

Na tentativa de neutralizar o efeito bacteriostático do metronidazol, aumentou-se o número de lavagens da membrana filtrante antes da introdução do inóculo, no momento da filtração da amostra.

Repetiram-se os testes com a alteração do protocolo experimental acrescentando uma lavagem da membrana e os novos resultados indicaram

melhora na recuperação, aproximando a equivalência entre os métodos. Essa alteração também foi implementada no controle negativo do produto metronidazol.

Como os resultados com a carga de contaminação de 20 UFC ainda não foram considerados satisfatórios, após o aumento no número de lavagens, levantou-se a hipótese de que o método de coleta de alíquota em meio Tioglicolato e a inoculação nos frascos de meio de cultura SN poderiam estar causando estresse adicional ao micro-organismo, por expor o micro-organismo ao oxigênio do ar, o que nesse caso é particularmente danoso visto que esse micro-organismo é anaeróbico obrigatório.

Nesse caso, a abordagem utilizada foi o emprego de escalpe para transferência à vácuo (BD Vacumtainer® – Becton Dickinson SA para transferência)

Após a adoção dessa medida a recuperação desse micro-organismo foi equivalente à recuperação apresentada pelo MFCP.

Em suma, para *Clostridium sporogenes*, as adequações experimentais adotadas foram o aumento do número de lavagens nos testes realizados com metronidazol e utilização de escalpe para transferência das amostras.

B) *Aspergillus brasiliensis*

Durante a execução dos experimentos na prova de conceito foi possível identificar que *A. brasiliensis* apresentou baixa taxa de recuperação em Bact/Alert® em todos os produtos testados.

Na investigação da não recuperação de *A. brasiliensis*, foi verificado que houve recuperação desse micro-organismo somente em MFCP e não em BCTA.

Considerando que as condições experimentais foram as mesmas das outras cepas testadas que tiveram recuperação de 100%, foi levantada hipótese de que poderia haver algo interferindo negativamente na recuperação dos micro-

organismos, mais particularmente a temperatura de incubação de BCTA de $32\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, visto que não é a temperatura ideal de incubação desse micro-organismo.

Entretanto, há dados na literatura que descrevem que a taxa de recuperação de fungos e leveduras em temperaturas mais altas $30-35^{\circ}\text{C}$ é equivalente à recuperação em temperaturas inferiores $20-25^{\circ}\text{C}$, apesar de não ser a temperatura ótima de incubação desses micro-organismos (MARSHALL; POULSON e MOLDENHAUER, 1998)

Dessa forma, outra hipótese levantada foi de que esse micro-organismo se desenvolve na forma de hifas, o que faz com que sua distribuição no meio de cultura seja diferente da distribuição de bactérias e leveduras, caracterizando uma suspensão menos homogênea e portanto a coleta desse micro-organismo pode ser afetada pelo modo não homogêneo que esse se distribui no meio de cultura.

Face ao exposto, alternativa utilizada foi reduzir o volume de caldo caseína em que a membrana filtrante era inoculada para que houvesse maior concentração microbiana em solução nesse meio, para coleta de alíquota para inoculação em BCTA. Essa hipótese foi testada, demonstrando ser viável, pois foi observada uma recuperação de 100%.

5.3. QUALIFICAÇÃO DE DESEMPENHO

A qualificação de desempenho do Método microbiológico rápido foi feita, tomando como base os tópicos e critérios descritos no item 1.8.1.3.

5.3.1. Especificidade

Para avaliação da especificidade, foi feito teste de Concordância da proporção de amostras positivas/negativas entre o método rápido e o método

farmacopeico para cada tipo de micro-organismo com o objetivo de identificar se a proporção de amostras detectadas entre os dois métodos era equivalente para cada cepa testada.

Avaliando-se os resultados, pode-se identificar que nas três cargas de contaminação testadas (20; 2; 0,2UFC/teste) houve equivalência na proporção de amostras contaminadas detectadas em ambos os métodos.

Na medida em que a carga de contaminação foi diminuída, foi possível verificar que o número absoluto de amostras contaminadas detectadas foi diminuído de forma equivalente em ambos os métodos.

No caso de *A.brasiliensis* estatisticamente não houve evidência experimental de que os dois métodos detectaram as amostras contaminadas de forma equivalente quando contaminado com 2UFC/teste (Tabela 9).

Entretanto, quando submetido à carga de contaminação inferior em 0,2UFC/teste os métodos apresentaram equivalência estatística (Tabela 10).

Considerando-se que à medida que se diminui a concentração a proporção de amostras detectadas diminui e que 0,2UFC/teste foi a menor carga de contaminação testada, pode-se considerar que pelo fato de os métodos terem apresentado equivalência na concentração mais crítica, há evidência que em *A.brasiliensis* o método foi específico suficiente para esse micro-organismo.

Portanto, é possível afirmar que o método rápido tem especificidade para todas as cepas microbianas avaliadas.

5.3.2. Limite de Detecção

Por definição o limite de detecção é a capacidade do método em detectar a menor quantidade de contaminação possível. Pode-se verificar na Tabela 10 que nos testes realizados com carga de contaminação de 0,2UFC/teste, que foi a menor carga testada, houve equivalência entre os dois métodos.

Os resultados apresentados pelos testes de equivalência (tabela 10) demonstram na prática que a conclusão teórica de que o limite de detecção mais provável de BCTA é de 1 UFC é verdadeira (VERDONK; 2010)

Adicionalmente, quando foi realizado teste de concordância considerando todos os resultados apresentados entre os dois métodos (tabela 11), os resultados demonstraram equivalência, sendo possível concluir que os métodos tem sensibilidade equivalente em qualquer que seja a concentração.

Apesar da faixa de temperatura de incubação adotada pela metodologia baseada na detecção de CO₂ não ser o valor ideal para o cultivo de bactérias psicrófilas e alguns fungos, ela se mostrou capaz de recuperar tais micro-organismos.

5.3.3. Robustez

A execução do método entre diferentes analistas e a recuperação microbiana após a transferência de inóculo de um meio de cultura para outro e, conforme avaliado, respectiva equivalência de recuperação demonstram que o método é robusto por suportar variações de material, operador e ambiente.

Outra evidência de robustez é a capacidade do método em detectar contaminação considerando-se a diferença de composição química entre os produtos testados.

Vale ressaltar que a tecnologia de detecção de resultados positivos em BCTA apresenta robustez superior ao MFCP, pelo fato de BCTA ser calibrável ao passo que MFCP depende de uma avaliação visual e subjetiva. O software de BCTA é validado e está conforme os requerimentos regulatórios da legislação brasileira. A senha é requerida em todas as funções do equipamento.

Face ao exposto, pode-se considerar que o método apresenta robustez superior ao método farmacopeico.

5.3.4. Equivalência

A) Parâmetros da validação

Considerando os parâmetros descritos nos itens 5.3.1 a 5.3.4, pode-se considerar que BCTA apresenta desempenho equivalente ao MFCP.

B) Tempo de detecção

Pode-se verificar na figura 16 que BCTA apresentou quatro valores de tempo de detecção (174,0; 184,4; 191,2; 241,4) que foram superiores ao tempo máximo de detecção apresentado por método farmacopeico que foi de 168h.

Entretanto, deve-se destacar que os valores 174,0h; 184,4h; 191,2; e 241,4 são referentes a amostras de *Clostridium sporogenes* que não foram detectadas pelo MFCP.

Dessa forma esses resultados, quando analisados isoladamente são evidência que BCTA apresentou maior sensibilidade na detecção de dessa cepa.

Nesse contexto, ao se descartar os resultados de amostras que não foram detectados pelo MFCP ,conforme pode ser verificado na figura 18 o tempo máximo de detecção obtido é de 169,5 horas o que é equivalente a 8 dias de avaliação.

Adicionalmente verifica-se nas figuras 18 e 17, respectivamente, que a média de tempo de detecção de BCTA é de 19,565h com 75% das amostras (3º quartil) apresentando resultados de detecção até 19,654h, ao passo que a média do tempo de detecção do MFCP é de 59,2h com 75% das amostras (3ºquartil) apresentando resultados de detecção até 72h.

Comparando-se os tempos de detecção de BCTA e MFCP, o processo de validação dá evidências de que BCTA requer 6 dias a menos para liberação de resultados, o que é expressivo, entretanto, pode-se considerar a possibilidade de otimizar as condições de trabalho de forma a favorecer detecção mais rápida, o que seria uma fase posterior à qualificação de desempenho com foco em otimização de resultados.

O equipamento BCTA apresenta a possibilidade de se utilizar algoritmos diferentes para detecção de micro-organismos que apresentem crescimento lento, o que seria aplicável para esse caso onde fungos são cultivados em temperatura não ótima, ou ainda, utilizar-se de estufas com temperaturas de incubação distintas ligadas ao mesmo aparelho o que não ocorreu nesse trabalho, por limitações de ordem financeira.

Essas são alternativas para otimização do método, onde acredita-se que qualquer uma das alternativas traria grande ganho no tempo de detecção, pois foram alternativas que demonstraram resultados satisfatórios em outros trabalhos. (KIELPINSKY *et. al.* 2005, MASTRONARDI *et. al.* 2010; PARVEEN *et. al.* 2011)

Outra alternativa seria a utilização de frasco diferente de meio de cultura, pois quando comparados diferentes tipos de frascos de meio de cultura do fornecedor do equipamento pode-se verificar que há diferença na capacidade de detecção. O meio de Cultura FAN® foi desenvolvido para aumentar a recuperação de micro-organismos aeróbicos (WEINSTEIN *et. al.*, 1995).

Foi verificado que em culturas de sangue, 6 dias são suficientes para detecção dos principais contaminantes no sangue o que inclui bactérias, fungos e leveduras, pois a maioria dos micro-organismos de importância clínica foram detectados em até 6 dias (REISNER, B.; WOODS G., 1999)

Quando os frascos de BCTA padrão (SA; SN) foram comparados aos frascos FAN, esses últimos, demonstraram maior taxa de recuperação microbiana e menor tempo de detecção (GIBB *et al* 1998)

Conforme descrito em literatura, observa-se que ao aumentar o volume de inóculo em BCTA, se reduz em média os tempos de detecção das amostras. (SOUZA *et.al.* 2012). Dessa forma, essa alternativa também, pode ser considerada

também como alternativa viável, para otimização dos resultados, da validação do método.

O BCTA já foi amplamente avaliado quanto à aplicação na detecção de contaminação microbiana em culturas de sangue, sendo demonstrado que, com carga microbiana baixa, houve detecção de crescimento microbiano no primeiro dia e quando avaliado utilizando-se micro-organismo de crescimento lento (*P. acnes*) esse período foi de 6 dias (MASTRONARDI *et. al.*, 2010).

Em estudo realizado com BCTA para detecção de fungos filamentosos em cultura de sangue incubados a 35°C, foi verificado que há uma grande variedade de fungos que são detectados por BCTA, inclusive *A.brasiliensis* (EVANS, 1995).

Apesar de haver diferença conceitual entre a aplicação na área Clínica e em Controle de Qualidade de Medicamentos, o histórico de utilização de BCTA é muito maior, o que conduz a uma maior citação de trabalhos da área clínica.

Esses resultados, são evidência de que BCTA, pode apresentar desempenho ainda superior quanto ao tempo de detecção, se aplicadas as condições ótimas de crescimento dos micro-organismos avaliados e também se avaliadas técnicas para otimização de resultados.

Entretanto, como o foco desse trabalho é a validação do método, não foram avaliadas alternativas para otimização de resultados.

C) Operacionalização do Bactt/Alert® e custos

O procedimento experimental requereu transferência de inóculo e envolveu um nível de manipulação da amostra superior ao requerido pelo método farmacopeico, sendo um fator que deve ser ponderado antes de sua implementação por requerer alto nível técnico dos operadores.

Durante o trabalho de validação foi possível identificar que BCTA requer reagentes mais dispendiosos, quando comparados ao MFCP. Isso implica que os custos unitários de cada teste de BCTA sejam superiores ao MFCP.

Entretanto, na medida que se aumenta o número de amostras se aumenta o benefício na utilização do método. Na decisão de implementação do método deve-se avaliar conjuntamente não só o tempo de liberação, mas também a mão-de-obra necessária para execução do teste, redução de riscos de contaminação durante execução, custo de reagentes e disponibilidade de suporte técnico a médio e longo prazo. (JASSON et al. 2010)

Portanto, o cálculo da relação custo benefício da implementação desse método deve considerar não somente o custo unitário do teste mas também os ganhos obtidos na redução do tempo requerido pelo teste e conseqüentemente os benefícios a médio e longo prazo (MOLDENHAUER, J.; SUTTON, 2004).

5.4. AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE VALIDAÇÃO DE BACT/ALERT®

Os métodos microbiológicos rápidos fazem parte de um leque de alternativas analíticas mais amplo. O guia da FDA sobre *Process Analytical Technology* (PAT) (FDA, 2004) preconiza que a qualidade do produto deve ser construída no processo e de que esse deve dispôr de mecanismos de controle de parâmetros analíticos durante sua execução para que o produto chegue ao final de seu processamento com qualidade assegurada, o que dispensaria a realização de testes na sua fabricação.

Nesse contexto, os métodos microbiológicos rápidos, surgem como alternativas para monitoramento de qualidade durante o processo, sobretudo os métodos que não dependem do crescimento microbiano, sendo particularmente aplicáveis em processos em que a esterilização terminal não é viável.

Há alternativas de aplicação em processo, como a eletroforese capilar, que recentemente, tem sido considerada como possível técnica para o teste de esterilidade (PETR. *et. al.*, 2009). Dentre outras alternativas, verifica-se também a aplicação de PCR em tempo real para detecção de contaminação microbiana (ALBERTONI, *et. al.* 2011).

Há resultados inclusive que indicam que método alternativo de esterilidade baseado em análise PCR já foi validado apresentando resultados com 27h. (JIMENEZ, 1999)

Apesar do surgimento de alternativas ao método de esterilidade farmacopeico e do avanço nas pesquisas, as autoridades regulatórias ainda são resistentes em aceitar sua utilização e também não há disponibilização por parte dos reguladores de orientações mais técnicas sobre a validação de métodos alternativos.

Verifica-se que a FDA é o órgão regulatório mais avançado na orientação de para validação e implementação de métodos microbiológicos rápidos. Na Europa, apesar de haver recomendação de como deve ser feita a validação do método o processo de submissão e aprovação para utilização de MMR é lento.

Nos Estados Unidos utiliza-se a alternativa de submissão do protocolo de comparação, o que é um instrumento que permite maior agilidade burocrática por alinhar, antes da validação do método, as expectativas regulatórias com a aplicação pretendida junto à empresa que irá utilizar o equipamento.(MOLDENHAUER, 2011)

Apesar de os reguladores europeus serem favoráveis à implementação do PAT, não são tão favoráveis à implementação dos métodos microbiológicos rápidos.

Atualmente verifica-se que o processo requer 18 meses entre a submissão e a revisão na Europa. (MOLDENHAUER, 2011)

As orientações descritas no *EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods*, na 33ª edição da Farmacopeia Americana e na 7ª edição da Farmacopeia Europeia não são suficientemente claras quanto ao número de réplicas a serem testadas, ao tratamento estatístico que deve ser dado e à formatação do protocolo de validação.

Na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira não existe orientação sobre validação de métodos microbiológicos alternativos e não há orientação regulatória sobre esse tema no Brasil. A ausência de normas sobre esse tema é fator complicador e quase impeditivo da utilização de métodos microbiológicos alternativos no Brasil.

Dessa forma, apesar de os métodos microbiológicos rápidos terem sido mais intensamente discutidos na última década, há ainda pouco entendimento sobre as tecnologias disponíveis no mercado, sobre o processo de validação e principalmente sobre o processo de documentação e regulamentação.

A variedade de tecnologias disponíveis, cujos princípios são tão distintos, favorece a falta de entendimento sobre o tema, pois há várias alternativas de MMR's sendo estudadas ao mesmo tempo, particularmente nos últimos dez anos, com aplicação na indústria farmacêutica.

A falta de entendimento e discussão sobre esse assunto contribui para que o desenvolvimento do processo de validação e os requisitos exigidos ainda não sejam claros o suficiente, o que dá margem ao questionamento.

Nos Estados Unidos nota-se que a FDA dá grande enfoque na detecção de micro-organismos de crescimento lento em métodos baseados no crescimento microbiano (FDA, 2008; KIELPINSKY *et. al.*, 2005)

Entretanto, esse enfoque, não leva em consideração que micro-organismos de crescimento lento, são menos virulentos e têm menor importância clínica (SOUZA *et.al.* 2012).

O excessivo enfoque na detecção de micro-organismos de crescimento lento e no limite de detecção nos métodos alternativos não levam em consideração que a amostragem ainda é a principal limitação do teste de esterilidade.

Além disso, sabe-se que alguns micro-organismos patogênicos não são cultiváveis como, por exemplo, *Helicobacter pylori* e *Vibrio Cholera* (MURRAY *et. al* 1998).

O fato de o teste de esterilidade ser destrutivo e portanto, depender de amostragem, como também sua incapacidade de detectar qualquer tipo de contaminante, são as maiores limitações do teste de esterilidade.

Quando analisamos o teste de esterilidade sob a óptica da abordagem PAT, considerando-se as tecnologias disponíveis no mercado, há essencialmente dependência de amostragem do lote, sendo portanto, ainda impossível o monitoramento da esterilidade de 100% das unidades produzidas.

Dessa forma, mesmo com o avanço das tecnologias de métodos microbiológicos rápidos, uma das principais limitações do teste de esterilidade, que é amostragem, ainda não foi superada, o que faz com que o teste ainda seja mais uma das medidas de monitoramento do processo, mas não possui caráter comprobatório de que a esterilidade foi alcançada.

Atualmente é dada ênfase no fato de que métodos alternativos baseados em crescimento são falhos em detectar todo o tipo de contaminação. Essa abordagem que suprime o foco da validação, que na realidade é comprovar a equivalência frente ao método farmacopeico e não desafiar o método rápido quanto às deficiências intrínsecas ainda ao teste de esterilidade.

Observa-se que no *EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods*, os critérios de validação de métodos microbiológicos alternativos foram definidos em analogia ao processo de validação de métodos físico-químicos, onde são definidos parâmetros já citados nesse trabalho, como o Limite de detecção onde é requerido que seja testada quantidade inferior a 1 UFC.

Por definição, 1UFC é uma estimativa da menor quantidade de células que por divisão binária pode dar origem a uma colônia de micro-organismos. Nos métodos microbiológicos farmacopeicos, analogamente, é a menor quantidade de células que pode originar uma resposta analítica, tratando-se portanto de uma definição não exata.

Enquanto que, 1 UFC pode ser equivalente a 1 célula, geralmente pode representar mais do que isso, pois células geralmente tendem a se arranjar em grumos.

Dessa forma há alguns termos preconizados por esse guia cuja finalidade é meramente estatística, mas na prática tem pouco sentido como, por exemplo, orientação para teste com carga inferior a 1 UFC.

O hiato nessa analogia reside no fato de que a precisão/exatidão de métodos físico químicos são incomparáveis aos que podem ser obtidos com métodos microbiológicos, pois diferentemente de íons e moléculas, microrganismos não possuem distribuição browniana em solução.

Nesse sentido a abordagem da Farmacopeia Americana e Européia são mais coerentes ao preconizarem a utilização de carga de contaminação de 1 a 5 UFC por teste, para os testes de limite de detecção.

Portanto, considerando-se os resultados obtidos nesse trabalho, pode-se considerar que a fase de qualificação de desempenho poderia ter sido simplificada utilizando-se somente uma carga de contaminação, sendo de 1 a 5 UFC por teste.

Quanto ao foco do processo de validação desse trabalho, a avaliação de SPGV's implica na utilização do método indireto por filtração.

Nesse caso, as vantagens analíticas observadas, são as vantagens inerentes ao próprio método, que essencialmente são: o teste com maior volume de amostra e a captura de todos os possíveis contaminantes.

Pela característica de inoculação indireta a capacidade de detecção do método rápido é favorecida: a pré incubação favorece a recuperação microbiana em BCTA.

SPGV's são esterilizadas por processo de esterilização terminal e dessa forma, questiona-se a capacidade do teste de esterilidade em detectar contaminação microbiana, após processo de esterilização, pois supõe-se que se houver micro-organismos viáveis após a esterilização, os mesmos estarão estressados e sua capacidade de proliferação estará comprometida.

Entretanto, verifica-se que a recuperação microbiana de micro-organismos estressados por processos térmicos é pouco afetada. De fato, o número de micro-organismo no inóculo inicial é reduzido após o tratamento térmico e os micro-

organismos viáveis sobreviventes têm seu crescimento retardado a período de 3 a 4h.(GRAY, 2011)

A escolha dos micro-organismos desafio utilizados nesse trabalho teve como base as cepas propostas para o teste de promoção de crescimento nas farmacopeias, ou controle positivo, que representam as principais fontes de contaminação de produtos estéreis e também potencialmente as mais perigosas.

Como o propósito desse trabalho não foi a avaliação de um processo esterilizante, mas sim a avaliação do método, acredita-se que a escolha deveria se basear nas cepas que o MFCP obrigatoriamente deve detectar.

Deve-se considerar que a importância na validação desse método com foco no Controle de Qualidade de Medicamentos, isolados ambientais que também representem potencial de contaminação, devem ser incluídos no processo de validação.(SUTTON; 2012)

BCTA apresenta custo unitário por teste muito superior ao MFCP e, portanto, sua implementação deve ser avaliada quanto aos benefícios que BCTA pode trazer frente à aplicação pretendida e a possibilidade de amortização de custo a médio e longo prazo.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a aplicação de BCTA para teste de esterilidade em SPGV é passível de validação e apresenta desempenho superior ao MFCP com redução de 6 dias no tempo requerido para liberação de resultados.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDOU, M.A.F. Comparative study of seven media for sterility testing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.63, n.1, p.23-26, 1974.

ALBERTONI, G.; ANDRADE, S.S.; ARAÚJO, P.R.; CARVALHO, F.O.; GIRÃO, M.J.; BARRETO, JA. Evaluation of two detection methods of microorganisms in platelet concentrates. **Transfusion Medicine**, v.21, n.6, p.408-416, 2011.

AMANN, R.I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v.59, n.1, p.143-169, 1995.

BAIRD, R.M. Sterility assurance: concepts, methods and problems. In: FRAISE, A.P.; LAMBERT, P.A.; MAILLARD, J.-Y.; RUSSELL, A.D.; HUGO, W. B.; AYLIFFE, G.A.J., eds. **Russell, Hugo & Ayliffe's principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 4.ed. Oxford: Blackwell Pub., 2004. p.526-539.

BATHGATE, H.; LAZZARI, D.; CAMERON, H.; MCKAY, D. The incubation period in sterility testing. **Journal of Parenteral Science and Technology**, v.47, n.5, p.254-257, 1993.

BRASIL. Sistema Único de Saúde. Legislação. **Resolução RDC n.17, de 16 de abril de 2010**. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103711-17.html>. Acesso em: 30 Fev. 2013.

BRASIL. Resolução RDC n.48, de 20 de setembro de 2011. Concede prazo para que as empresas fabricantes de soluções parenterais de grande volume se adequem às disposições da Farmacopeia Brasileira quanto ao novo período de quarentena para a realização do teste de esterilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.183, 19. abr. 2010. Seção 1, p.94-110.

BOWMAN, F.W. The sterility testing of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58, n.11, p.1301-1308, 1969.

BRYCE, D.M. Tests for the sterility of pharmaceutical preparations: the design and interpretation of sterility tests. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.8, n.1, p.561-572, 1956.

BRITISH Pharmacopoeia. London: General Medical Council, 1932.

BUGNO, A.; PINTO, T.J.A. The Influence of incubation conditions in sterility tests. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.57, n.6, p.399-403, 2003.

CUNDELL A.M. Historical perspective on methods development. In: EASTER, M.C., ed. **Rapid microbiological methods in pharmaceutical industry**. Boca Raton: InterPharm, CRC Press, 2003. p.9-17.

BREATHNACH, A.; EVANS, A.B. Growth and detection of filamentous fungi in the BacT/Alert blood culture system. **Journal of Clinical Pathology**, v.48, n.7, p.670-672, 1995.

FARMACOPEIA Brasileira. 5.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v.1, p.253-261.

FLEYHART, D.; BOREK, A.P.; WAKEFIELD, T.; DICK, J.; CARROLL, K.C. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to Bact/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.3, p.816-821, 2007.

GIBB, A.P.; HILL, B.; CHOREL, B. Comparative study of BacT/Alert FAN bottles and standard BacT/Alert bottles. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.32, n.3, p.159-163, 1998.

GRAY, J.C.; STAREK, A.; BERCHTOLD, M.; HECKER, W.; NEUHAUS, G.; WIRTH, A. Growth-promoting properties of different solid nutrient media evaluated with stressed and unstressed micro-organisms: pre-study for the validation of a rapid sterility test. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.64, n.3, p.249-263, 2010.

GRESSETT, G.; VANHAECKE, E.; MOLDENHAUER, J. Why and how to implement a rapid sterility test. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.62, n.6, p.429-444, 2008.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.18, p.4765-4774, 1998.

HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T.H.; BOHANNAN, B.J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.10, p.4399-4406, 2001.

JAPANESE Pharmacopoeia. 16.ed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2011.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. **Food Microbiology**, v.27, n.6, p.710-730, 2010.

MOLDENHAUER, J. **Rapid sterility testing**. Bethesda: PDA, River Grove: Davis Healthcare International Publ., 2011.

JENNISON, M.W.; WADSWORTH, G.P. Evaluation of the errors involved in estimating bacterial numbers by the plating method. Department of Biology and Public Health, and Department of Mathematics, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts. **Journal of Bacteriology**, v.39, n.4, p.389-397, 1940.

JIMENEZ, L.; IGNAR, R.; D'AIELLO, R.; GRECH, P. Use of PCR analysis for sterility testing in pharmaceutical environments. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.8, n.1, p.11-20, 2000.

KHUU, H.M.; PATEL, N.; CARTER, C.S.; MURRAY, P.R.; READ, E.J. Sterility testing of cell therapy products: parallel comparison of automated methods with a CFR-compliant method. **Transfusion**, v.46, n.12, p.2071-2082, 2006.

KIELPINSKI, G.; PRINZI, S.; DUGUID, J.; DU MOULIN, G. Roadmap to approval: use of an automated sterility test method as a lot release test for Carticel®, autologous cultured chondrocytes. **Cytotherapy**, v.7, n.6, p.531-541, 2005.

KHUU, H.M.; PATEL, N.; CARTER, C.S.; MURRAY, P.R.; READ, E.J. Sterility testing of cell therapy products: parallel comparison of automated methods with a CFR-compliant method. **Transfusion**, v.46, n. 12, p.2071-2082, 2006.

KNUDSEN, L.F. Sample size of parenteral solutions for sterility testing. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.38, n.6, p.332-337, 1949.

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**, v.52, n.4, p.165-169, 1998.

MASTRONARDI, C.; PERKINS, H.; DERKSEN, P.; DenADMIRANT, M.; RAMÍREZ-ARCOS, S. Evaluation of the BacT/Alert 3D system for the implementation of in-house quality control sterility testing at Canadian blood services. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.48, n.8, p.1179-1187, 2010.

MEZAROS, A. Alternative technologies for sterility testing. In: EASTER, M.C., ed. **Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry**. Boca Raton: CRC Press, 2003. cap.10, p.179-186.

MOLDENHAUER, J.; SUTTON, S. Towards an improved sterility test. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.58, n.6, p.284-286, 2004.

MOLDENHAUER, J. Viability-based rapid microbiological methods for sterility testing and the need for identification of contamination. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.60, n.2, p.81-88, 2006.

MORGAN, C.A.; BIGENI, P.; HERMAN, N.; GAUCI, M.; WHITE, P.A.; VESEY, G. Production of precise microbiology standards using flow cytometry and freeze drying. **Cytometry, Part A**, v.62A, n.2, p.162-168, 2004.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S. **Medical microbiology**. 3.ed. Saint Louis: Mosby, 1998. 719p.

NYSTRAND, R. Microbiology of water and fluids for hemodialysis. **Journal of the Chinese Medical Association**, v.71, n.5, p.223-229, 2008.

PALARASAH, Y.; SKJOEDT, M.O.; VITVED, L.; ANDERSEN, T.E.; SKJOEDT, K.; KOCH, C. Sodium polyanethole sulfonate as an inhibitor of activation of complement function in blood culture systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.3, p.908-914, 2010.

EVALUATION, validation and implementation of new microbiological testing methods. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.54, n.3, suppl.1, p.1-39, 2000. [PDA Technical Report, n.33].

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 780p.

PETR, J.; JIANG, C.; SEVCIK, J.; TESAROVA, E.; ARMSTRONG, D.W. Sterility testing by CE: a comparison of online preconcentration approaches in capillaries with greater internal diameters. **Electrophoresis**, v.30, n.22, p.3870-3876, 2009.

RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, v.57, p.369-394, 2003.

REISNER, B.; WOODS, G. Times to detection of bacteria and yeasts in BACTEC 9240 blood culture bottles. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.2024-2026, 1999.

ROLF, R.D.; HENTGES, D.J.; CAMPBELL, B.J.; BARRETT, J.T. Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, n.2, p.306-313, 1978.

PARVEEN, S.; KAUR, S.; DAVID, S.A.; KENNEY, J.L.; MCCORMICK, W.M.; GUPTA, R.K. Evaluation of growth based microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. **Vaccine**, v.29, n.45, p.8012-8023, 2011.)

SOUZA, S.; BRAVO, M.; POULIN, T.; VANDERPOOL, S.; KAMEL, H.; TOMASULO, P.; SU, L.L. Improving the performance of cultured-based bacterial screening by increasing the sample volume from 4mL to 8mL in aerobic culture bottles. **Transfusion**, v.52, n.7, p.1576-1582, 2012.

SUTTON, S. Validation of alternative microbiology methods for product testing. **PharmTech**, p.118-122, 2005. Disponível em: <http://www.pharmtech.com/pharmtech/Analytics/Validation-of-Alternative-Microbiology-Methods-for/ArticleStandard/Article/detail/157788>. Acesso em: 15 Mai. 2013.

SUTTON, S. What is an "Objectionable Organism". **American Pharmaceutical Review**, v.15, n.6, 2012. Disponível em: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/122201-What-is-an-Objectionable-Organism-Objectionable-Organisms-The-Shifting-Perspective/>. Acesso em: 04 Jun 2013.

THORPE, T.C.; WILSON, M.L.; TURNER, J.E.; DIGUISEPPI, J.L.; WILLERT, M.; MIRRETT, S.; RELLER, L.B. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.7, p.1608-1612, 1990.

UNITED States Pharmacopoeia. 11.ed. Easton: Mack, 1936. p.851.

UNITED States Pharmacopoeia. 12.ed. Easton: Mack, 1942. p.609-614.

UNITED States Pharmacopoeia. 13.ed. Easton: Mack, 1947 p.689-692.

UNITED States Pharmacopoeia 14.ed. Easton: Mack, 1950 p.758-762.

UNITED States Pharmacopeia. 18.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1970. p.851-857.

UNITED States Pharmacopeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990. p.1483-1488.

UNITED States Pharmacopeia. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.1686-1690.

UNITED States Pharmacopeia: USP24; The National Formulary: NF19. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.1818-1823, 2099-2106.

UNITED States Pharmacopeia: USP35; The National Formulary: NF30. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: PAT – a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance.** Rockville: Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, 2004. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070305.pdf>. Acesso em: 23 Jan. 2013.

VERDONK, G.P.; WILLEMSE, M.J.; HOEFS, S.G.; CREMERS, G.; VAN DEN HEUVEL, E.R. The Most Probable Limit of Detection (MPL) for rapid microbiological methods. **Journal of Microbiological Methods**, v.82, n.3, p.193-197, 2010.

VICENTE, D.; TRALLERO, P. Tetraciclinas, sulfamidas y motronidazol. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.28, n.2, p.122-130, 2010.

WEINSTEIN, M.P.; MIRRETT, S.; REIMER, L.G.; WILSON, M.L.; SMITH-ELEKES, S.; CHUARD, C.R.; JOHO, K.L.; RELLER, L.B. Controlled evaluation of BacT/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture bottles for detection of bacteremia and fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.4, p.978-981, 1995.