

Slide 1

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Teste de esterilidade

Profa. Dra. Márcia E. S. Ferreira
Bloco S – Sala 13 – Térreo – Ramal: 150265
mesfe@fcfrp.usp.br

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

TESTE DE ESTERILIDADE

Detectar microrganismos contaminantes em produtos que já sofreram tratamento esterilizante

HISTÓRICO

1932 – Farmacopéia Britânica – produtos em forma líquida, caldo peptonado, incubação a 37°C por 5 dias
1936 – USP XI
1942 – USP XII - aeróbios e anaeróbios
USP XIII – detecção de fungos
Década de 60 – inoculação indireta
Atualmente: método inoculação direta e indireta – incubação 14 dias

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

O teste de esterilidade é o teste realizado para detectar microrganismos contaminantes em produtos que já sofreram tratamento esterilizante. Ele é a demonstração de que um produto é estéril por meio da realização de um ensaio microbiológico, em amostras de determinado lote.

A seguir veremos um breve histórico a respeito do teste de esterilidade e como ele foi sofrendo modificações ao longo dos anos visando à obtenção de resultados mais confiáveis.

Embora a terapêutica parenteral tenha tido origem no século XIX, o primeiro método oficializado do teste de esterilidade foi na Inglaterra, em 1932, e apresentado na farmacopeia, neste mesmo ano. Este exigia a execução do teste em produtos sob a forma líquida, mediante utilização de caldo peptonado com incubação a 37°C, durante 5 dias, visando à detecção de bactérias aeróbicas.

Em 1936 a USP adotou a mesma metodologia, a qual foi sofrendo inovações posteriores, de modo a aumentar a segurança dos resultados obtidos nesse teste.

Na edição seguinte, o teste foi modificado para permitir o desenvolvimento de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos, bem como microaerófilos.

Na USP XIII, a preocupação se estendeu para detecção de fungos, utilizando-se meio de cultura contendo mel, com incubação de 22 a 25°C, durante 15 dias.

Uma inovação marcante ocorreu no fim da década de 60, com a introdução do método de inoculação indireta da amostra.

Atualmente o método de inoculação pode ser direta ou indireta, e visa a recuperação de bactérias aeróbicas, microaerófilas e anaeróbicas, além de fungos, com incubação por um período de 14 dias.

Como pode ser observado pela evolução da metodologia, a preocupação inerente à melhoria do teste de esterilidade visa verificar com mais segurança a qualidade do processo esterilizante, empregado durante a fabricação de medicamentos estéreis, bem como manipulações assépticas, levando-se em consideração o aspecto probabilístico da esterilização e o risco da contaminação.

ESPECIFICAÇÕES DO AMBIENTE

- ❖ **Compartimento pequeno - capela com fluxo laminar vertical ou horizontal**
- ❖ **Fácil limpeza e desinfecção - método de limpeza validado (exposição de placas de Petri)**
- ❖ **Parede livre de irregularidades**
- ❖ **Alimentação de ar filtrado, com pressão positiva**
- ❖ **Lâmpadas germicidas**
- ❖ **Operadores (treinamento, estado de saúde e higiene, vestimenta)**

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

Para que o teste de esterilidade tenha validade, a qualidade do ambiente de execução do ensaio é importante, devendo ser muito bem controlada e conhecida, a fim de evitar resultados falso-positivos.

A área de realização do teste consiste em compartimento pequeno (capela com fluxo laminar vertical ou horizontal), que deve ser mantido em sala limpa, a fim de se aumentar a meia vida dos filtros e pré-filtros (quando utilizados).

Deve ser de fácil limpeza e desinfecção, cujo procedimento deve ter sido validado. Essa limpeza pode ser verificada pela exposição de placas de Petri, contendo meio de cultivo.

A superfície interior desse compartimento deve ser livre de irregularidades, a fim de impedir a deposição de partículas.

A alimentação do ar filtrado pode ser pelo teto ou lateral, porém sempre com pressão positiva para evitar a entrada de contaminantes externos ao compartimento.

Deve ser equipado com lâmpadas germicidas para ajudar na desinfecção do compartimento.

Além da qualidade do ambiente em que o teste será realizado, o operador é outro fator a ser considerado como fonte de contaminação. O treinamento é de fundamental importância, mas deve-se considerar, também, o estado de saúde e higiene do operador, que influenciam na qualidade dos locais de trabalho e consequentemente na segurança do ensaio propriamente dito. Com relação à vestimenta, a utilização destas deve ser criteriosa, visando proteger os operadores bem como obter eficácia adequada durante a realização do teste de esterilidade.

Ensaio-limite → amostragem

Amostragem – segurança – extrapolação para o lote
Teste de esterilidade complementa as informações sobre o processo
operacional esterilizante

Lote – total de unidades com igual risco de contaminação
Esterilização térmica ou química – ciclo do processo
Envasamento asséptico – total de unidades decorrentes do enchimento

$\sqrt{N + 1}$
OMS: $0,4 \sqrt{N}$ } Matéria prima

N = número de recipientes pertencentes ao lote

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

Sendo o teste de esterilidade um ensaio limite, exige-se critério de amostragem que procure oferecer segurança no resultado final, quando extrapolado ao lote. O teste de esterilidade irá complementar as informações sobre o processo operacional esterilizante e/ou manipulação asséptica do produto.

A segurança do resultado do teste de esterilidade será tanto maior quanto maior for a quantidade das amostras ensaiadas; entretanto, como existem problemas de ordem prática e econômica, é imprescindível estabelecer um critério de amostragem a fim de se definir quanto de cada lote deve ser submetido ao teste.

Sendo assim, precisamos definir o que é um lote. Lote é o total de unidades com igual risco de contaminação. Quando a esterilização térmica ou química é aplicada ao produto, o conceito de lote está relacionado ao ciclo deste processo, sendo pertencente ao mesmo lote o total de unidades advindos deste ciclo. No caso do envasamento asséptico, o lote é conceituado como sendo o total de unidades decorrente de uma operação de enchimento, que deverá acontecer num período inferior a 24h consecutivas.

Em se tratando de matéria prima, cada embalagem deveria ser submetida à amostragem, o que não é possível devido ao quesito segurança e praticidade. Nestes casos, sugere-se como critério de amostragem a aplicação da fórmula raiz quadrada de $N + 1$, onde N corresponde ao número de recipientes pertencentes ao lote. Para o mesmo caso, a Organização mundial de Saúde recomenda a fórmula $0,4 \times$ raiz quadrada de N . Assim, do lote serão retiradas quantidades suficientes de recipientes para a realização do teste.

Com relação ao produto acabado, vimos na aula anterior que existem tabelas indicando a quantidade de recipientes de um lote que devem ser submetidos ao teste de esterilidade, bem como a quantidade a ser utilizada de cada recipiente.

PREPARO DA AMOSTRA

Desinfecção da superfície externa de frascos
fenol 5%, álcool iodado, formaldeído 5%, álcool isopropílico
(imersão ou nebulização)



Inoculação direta ou indireta da amostra

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

A execução do teste de esterilidade em produtos farmacêuticos deve ser precedida pelo preparo das amostras, de maneira a evitar resultados falsos. O preparo consiste em efetuar um tratamento, visando à desinfecção da superfície externa dos frascos, ampolas ou outros materiais de acondicionamento pelo uso de soluções antissépticas, voláteis ou não, tais como fenol 5%, álcool iodado, formaldeído 5%, álcool isopropílico. Essa desinfecção pode se dar por imersão ou nebulização; entretanto, após o tempo necessário, exige-se a perfeita remoção deste agente químico.

A inoculação da amostra, ao meio de cultura, pode se dar de modo direto ou indireto, sendo as razões para o emprego de uma ou outra técnica decorrente de fatores diversos, como facilidade e disponibilidade circunstanciais além da eficiência desejada ou limitações de ordem econômica.

INOCULAÇÃO DIRETA

meio líquido	meio sólido
	

Volume pequeno: tomada de ensaio integral
Volume grande: tomada parcial
Representatividade da amostra: quanto maior o volume testado maior a probabilidade em detectar contaminante
Proporção entre amostra e meio – não impedir o crescimento dos contaminantes

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

A inoculação direta é o método utilizado desde a oficialização do método, em 1932, e tem sido aplicado até os dias atuais. Ela consiste na inoculação de quantidades ou volumes pré-estabelecidos da amostra em volumes estipulados de diversos meios de cultura, na forma líquida ou mediante semeadura da amostra em nutriente sólido.

Quando a amostra a ser analisada possui um volume pequeno, toda a amostra poderá ser analisada. Entretanto, conforme aumenta o volume a ser analisado, apenas uma parte dessa amostra será submetida à análise. Este aspecto é discutível no que diz respeito à representatividade da amostra, pois, quanto maior o volume testado, maior a probabilidade de detectar o contaminante, caso ele esteja presente. Além disso, deve-se ter em mente a proporção entre amostra e meio de cultura, a fim de não impedir o crescimento dos contaminantes pela diluição dos nutrientes do meio.

INOCULAÇÃO DIRETA

- ✓ Amostras lipófilas: adicionar substâncias inertes tensoativas ao meio (facilitar dispersão)
- ✓ Amostras semi-sólidas hidrossolúveis: fluidificação com líquidos fisiológicos
- ✓ Amostras sólidas ou líquidas: conservantes (inativação dos conservantes – teste de neutralização – validação)
- ✓ Fármacos antimicrobianos – inativadores específicos
- ✓ Amostra em suspensão ou pó: turvação – subcultura
- ✓ Correlatos: líquido de lavagem da superfície interna ou de ambas transferido para o meio de cultura

LIMITAÇÃO DO MÉTODO

Probabilidade de se aprovar lote contaminado devido:

- . Amostragem restrita
- . Atividade inibitória residual no produto

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

O método de inoculação direta é simples e de fácil execução; porém, conforme a natureza das amostras, exigem-se recursos intermediários a fim de que o resultado do teste seja válido.

Em amostras lipófilas, imiscíveis ao meio, é necessário adicionar substâncias tensoativas ao meio para facilitar a dispersão da mesma no meio de cultura aquoso.

Amostras semissólidas hidrossolúveis são facilmente testadas através da fluidificação com líquidos fisiológicos validados.

Amostras sólidas ou líquidas, que possuem conservantes, devem ter o seu sistema conservante inativado antes da realização do teste de esterilidade. Lembrando que esse método de neutralização (inativação) do sistema conservante deve estar validado, ou seja, não deve comprometer a viabilidade dos microrganismos, caso estejam presentes.

No caso de fármacos antimicrobianos deve-se utilizar inativadores específicos. Ex. penicilina inativada por enzimas penicilinasas; beta-lactâmicos inativados por beta-lactamases.

Quando a amostra a ser testada está sob a forma de suspensão ou trata-se de pó insolúvel no meio de cultura, a interpretação dos resultados pode ser dificultada pela não distinção entre a turvação promovida pela amostra e aquela resultante do crescimento microbiano. Neste caso, certifica-se da presença de contaminante viável mediante a subcultura, executada entre o terceiro e o sétimo dia de incubação.

No caso dos correlatos, o líquido resultante da lavagem da superfície interna, externa ou de ambas, deve ser transferido para o meio de cultura.

A limitação da inoculação direta reside na probabilidade de se aprovar um lote contaminado devido à amostragem restrita ou devido à atividade inibitória residual no produto.

<p>VANTAGENS simples fácil execução pouco treinamento baixo nível de contaminação acidental</p>
<p>DESVANTAGENS baixa representatividade da amostra consumo elevado de meios de cultura e de vidraria interferência da turbidez do produto possibilidade de resíduos de agentes inibitórios restrição para volumes a partir de 100 mL</p>
<p><small>Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos Ribeirão Preto - 2020</small></p>

Resumidamente, pode-se apontar como vantagens da inoculação direta a sua simplicidade, pouca manipulação e fácil execução. Deste modo, requer pouco treinamento e caracteriza-se por baixo nível de contaminação acidental. Por outro lado, as desvantagens incluem baixa representatividade da amostra, consumo elevado de meios de cultura e de vidraria, interferência da turbidez do produto (que pode ser contornada utilizando-se subcultura), possibilidade de atividade residual de agentes inibitórios e restrição para volumes a partir de 100 mL.



A inoculação indireta baseia-se no tratamento prévio da amostra com solubilização ou lavagem em líquidos fisiológicos, seguida de filtração esterilizante, lavagem da membrana com soluções validadas e inoculação da mesma ao meio de cultura. Com isto, o produto a ser testado não entra em contato com o meio de cultura. Este método foi aplicado inicialmente para substâncias antibióticas, principalmente aquelas que não podiam ser inativadas.

INOCULAÇÃO INDIRETA

- ❏ **Membranas: ésteres de celulose, diâmetro de 47 mm, tamanho de poro de $0,45 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ou $0,22 \mu\text{m}$**
- ❏ **Produtos com conservantes ou antibióticos - lavagem da membrana com solução peptonada contendo os inativadores específicos ou solubilizantes**
- ❏ **Cuidado especial em relação ao ambiente – mais susceptível à contaminação**

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

Na inoculação indireta geralmente utilizam-se membranas de ésteres de celulose, com diâmetro de 47 mm e tamanho de poro de $0,45 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ou $0,22 \mu\text{m}$. Existe certa divergência na escolha de filtros para uso industrial e laboratorial. Geralmente as indústrias utilizam filtros com poro de $0,22 \mu\text{m}$ para a obtenção de produtos estéreis através da filtração, enquanto os laboratórios utilizam filtros com poro de $0,45 \mu\text{m}$ para a retenção dos microrganismos no teste de esterilidade.

Para produtos com conservantes ou antibióticos, após a filtração da amostra, deve-se proceder com a lavagem da membrana com solução peptonada (ou outro líquido que tenha sido validado) contendo os inativadores específicos ou atuando somente como solubilizantes, de modo que a quantidade residual do antibiótico (ou conservante) seja diluída e não seja transferida, juntamente com a membrana, para o meio de cultura.

Na inoculação indireta, as condições do ambiente devem ser muito bem controladas devido às múltiplas manipulações da amostra, o que aumenta o risco de contaminação da mesma.

<p>DESVANTAGENS</p> <p>maior nível de manipulação e preparações prévias exige maior treinamento técnico inadequada para suspensões, óleos, cremes e pomadas risco aumentado de falso-positivos</p> <p>VANTAGENS</p> <p>maior representatividade da amostra não carregamento de antibióticos ao meio de cultura (redução de falso negativo) redução do consumo de meio de cultura volumes de 1 mL até 5 L</p> <p><small>Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos Ribeirão Preto - 2020</small></p>
--

Resumindo, dentre as principais desvantagens do método de inoculação indireta podemos citar o maior nível de manipulação e preparações prévias necessárias, o que exige maior treinamento técnico e aumenta o risco de falso-positivos; é inadequada para suspensões, óleos, cremes, pomadas e outras substâncias não solubilizáveis. Por outro lado, esta técnica permite maior representatividade da amostra devido à conveniência em se testar grandes volumes ou, ocasionalmente, todo o conteúdo dos injetáveis de grande volume (1 mL até 5 L); não favorece o carregamento de antibióticos ou conservantes para o meio de cultura, o que resulta na redução de falsos-negativos e permite um consumo reduzido de meios de cultura.

MEIO DE CULTURA

Detectar microrganismos em produtos já “esterilizados”

Qual é o contaminante viável residual?

Qual é o agente de recontaminação do produto?

Meio de cultura é de vital importância

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

A finalidade do teste de esterilidade consiste em detectar microrganismos contaminantes em produtos que já sofreram algum tratamento esterilizante, durante o ciclo de fabricação. A partir deste estágio, os produtos devem ser manipulados assepticamente, a fim de não violar a sua esterilidade. Sendo assim, não é do conhecimento do analista qual é o contaminante viável residual ou agente de recontaminação do produto, antes de efetuar o ensaio. Por esta razão, a escolha do meio de cultura é de vital importância no sentido de oferecer as condições ideais para a multiplicação de microrganismos, os mais diversos possíveis e com exigências diferentes para seu crescimento.

<p>CALDO TIOGLICOLATO Extrato de levedura Triptona Dextrose Tioglicolato de sódio Cloreto de sódio L-cistina Resazurina Agar</p>	<p>CALDO CASEÍNA-SOJA Digestão enzimática de caseína Digestão papaica de farinha de soja Cloreto de sódio Fosfato de potássio bibásico Dextrose</p>
<p>Comprovação da eficácia ou capacidade promotora de crescimento do meio de cultura Inóculo: 10 a 100 microrganismos viáveis Acompanhamento do teste Temperatura: 30-35°C / 20-25°C</p>	
<p>Interpretação: se um tubo apresentar contaminação: RETESTE – SEGUNDO RETESTE – APROVAÇÃO (não deve haver crescimento em nenhum dos tubos do último reteste)</p>	
<p><small>Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos Ribeirão Preto - 2020</small></p>	

O mínimo exigido pelos compêndios oficiais é que se empreguem pelo menos dois tipos de meio de cultura:

- O caldo tioglicolato, que propicia o crescimento de uma ampla variedade de microrganismos fastidiosos, sejam aeróbicos, anaeróbicos ou microaerófilos. O tioglicolato de sódio presente na formulação é responsável por diminuir o potencial de óxido - redução do meio e neutralizar o efeito antibacteriano de conservantes mercuriais, se presentes no material a ser analisado. O indicador resazurina indica o estado de oxidação ou aerobiose.

- O caldo caseína soja é um meio completo que permite o crescimento de bactérias aeróbicas e fungos.

Os compêndios oficiais mencionam duas condições diferentes como temperaturas de incubação, variando de 30 a 35°C para o meio tioglicolato e de 20 a 25°C para o caldo caseína soja. O ensaio é acompanhado durante 14 dias.

Como para qualquer outro ensaio microbiológico, faz-se necessário comprovar a capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura utilizados, o que deve ser verificado, pelo menos, a cada lote. Para isso, inocula-se pequena quantidade (10 a 100UFC) dos microrganismos indicados nos compêndios oficiais e incuba-se nas temperaturas adequadas durante 3 (bactérias) ou 5 dias (fungos). O crescimento dos microrganismos indica que o meio de cultura está adequado.

Além disso, é necessário comprovar a esterilidade dos meios utilizados. Para isso, incuba-se os meios de cultura, prontos e esterilizados, pelo período de 14 dias. A não turvação dos mesmos indica que a esterilização foi eficiente.

No teste de esterilidade, a constatação de um tubo contaminado, de um total de 20 a 30 amostras analisadas, referente a um lote em teste, deve ser motivo de nova análise. Esta nova análise exigirá amostragem igual ou em número maior, geralmente o dobro, obedecendo critérios corretos para tal. Para a aprovação do lote não deve haver crescimento nos tubos deste reteste.

VALIDAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE

- **Qualificação da instalação**
 - Certificação da área onde se executam os testes
- **Qualificação operacional**
 - Qualificação do operador (BPF)
 - Qualificação do equipamento
- **Esterilidade dos meios de cultura, fluidos e dispositivos auxiliares**
- **Capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura**

Disciplina de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e de Cosméticos
Ribeirão Preto - 2020

A validação do teste de esterilidade deve ser estabelecida e documentada, demonstrando características de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

Inclui etapas de:

- Qualificação da instalação, ou seja, a certificação da área onde se executam os testes, incluindo os filtros, capelas de fluxo laminar e utilidades disponíveis e empregadas durante o procedimento;

- Qualificação operacional que inclui a qualificação do operador, o que impõe que o mesmo seja experiente e treinado, e a qualificação dos equipamentos, o que garante que os mesmos são adequados e precisos;

- Esterilidade dos meios de cultura, fluidos e dispositivos auxiliares. Deve-se ter o controle da procedência e lote de fabricação dos reagentes utilizados e os mesmos devem-se mostrar isentos de contaminação após o processo esterilizante. Os sistemas de filtração simples ou múltiplos, convencionais ou fechados, devem ter sua esterilidade comprovada, de forma a conferir segurança quanto à ausência de falso-positivo no teste. Estes devem ser avaliados empregando-se meios de cultura, comprovadamente estéreis, com inclusão dos fluidos a serem empregados, simulando as condições do teste.

- Capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura. As farmacopeias atuais orientam que seja avaliada a capacidade promotora de crescimento e apresentam sugestões quanto às cepas microbianas recomendadas para o teste. Cada lote de meio de cultura deve, após esterilização, ser inoculado com no máximo 100 células dos microrganismos indicados e, após incubação em condições apropriadas, deve mostrar crescimento considerável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pinto, T.J.A.; Kaneko, T.M.; Pinto, A.F. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. Ateneu Editora, São Paulo, 2010.
- Farmacopéia Brasileira, 6ª Ed., ANVISA, 2019.
- United States Pharmacopoeia. 40th Ed. Rockville: United States Pharmacopoeia Convention, 2017.
- www.anvisa.gov.br