

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE  
DO PORTO  
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

---

Marina Isabel Teixeira da Fonseca

---

CONTROLO DE QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICA NA INDÚSTRIA  
FARMACÊUTICA

---

Relatório de Estágio submetido à Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação institucional de Doutora Cristina Prudêncio, professora coordenadora da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico do Porto e co-orientação de Licenciada Natália Sofia Ferreira; Responsável Técnica do Laboratório de Microbiologia; Laboratórios Atral; Grupo AtralCipan.

D e z e m b r o , 2 0 1 2



**Esta dissertação foi escrita de acordo com as regras anteriores ao acordo ortográfico.**



Para o meu Pai, com saudade.



## **Agradecimentos**

Este foi mais um período de aprendizagem e enriquecimento da minha formação académica, revelando-se ainda mais promissor pela vivência de experiências num ambiente empresarial. Tive oportunidade de ver mais de perto, o dia-a-dia de uma indústria e perceber ainda melhor a importância de todo um trabalho conjunto. Não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, quer pelo apoio e motivação, quer pelo conhecimento que me transmitiram.

A minha primeira referência vai para a minha co-orientadora, Dra. Natália Sofia Ferreira, pelo apoio, científico e humano, dados desde o primeiro dia do meu estágio. Não poderia deixar de reconhecer a confiança que depositou em mim, o seu empenho e a sua disponibilidade bem como o facto de me ter acolhido como membro da sua equipa. Pelo constante incentivo e pela serenidade que sempre me transmitiu, um muito e reconhecido obrigada.

Agradeço também, à Professora Cristina Prudêncio e ao Professor Ruben Fernandes, por todo o apoio e conhecimentos transmitidos. Foram incansáveis. Muito obrigado.

Expresso os meus agradecimentos à administração do Grupo AtralCipan, pela oportunidade de ter realizado este estágio em ambiente industrial e ao Dr. José Manuel Martins, Director do departamento de Controlo de Qualidade, pelo apoio prestado durante a minha passagem pelo Atral, bem como aos restantes colaboradores desta organização pois também eles contribuíram para que o decorrer deste estágio caminhasse no melhor sentido, transmitindo-me muitas vezes palavras de sabedoria. O meu agradecimento especial à Sandra, à Joaquina e à Ana Rosa, Analistas do Laboratório de Microbiologia, que estiveram sempre ao meu lado, dando conselhos, transmitindo conhecimentos importantes e apoiando pessoal e profissionalmente, nunca vos irei esquecer.

Agradeço aos meus amigos pelo apoio transmitido, em especial à Marta e à Rita, que embora estejam longe, transmitiram-me sempre muita força e coragem. Finalmente, não poderia de deixar de agradecer à minha família, em especial à minha mãe Ana, irmã Cátia e ao meu namorado Bruno, pelo apoio, compreensão, espírito de entreaajuda e paciência que constantemente manifestaram.

A todos o meu sincero obrigado.





## Resumo

O presente Relatório de Estágio teve como objectivo analisar e discutir as competências adquiridas e desenvolvidas, durante o estágio, no controlo da qualidade microbiológica na indústria farmacêutica. O estágio, foi realizado no Laboratório de Microbiologia dos Laboratórios Atral, Grupo AtralCipan, localizado na Vala do Carregado, Castanheira do Ribatejo. Este teve a duração de aproximadamente dez meses e meio, com data de início a 21 de Setembro de 2011 e final de 10 de Agosto de 2012.

Numa fase inicial, foram adquiridas as aptidões necessárias para a aplicação das metodologias realizadas no laboratório de microbiologia com o estudo das normas, procedimento e legislação aplicada, com foco na importância das farmacopeias na indústria farmacêutica e formação para a realização de ensaios em Áreas de Processamento Asséptico, conhecendo e compreendendo os procedimentos a ter nestas.

Uma das principais metodologias realizadas, e desenvolvida neste relatório, compreendeu a análise de produtos farmacêuticos estéreis, com a aplicação de Testes de Esterilidade, pelo método de STERITEST e método Directo, com resultados que demonstraram a importância destas técnicas, da avaliação do ambiente em que são realizadas e do operador que as executa.

Os Testes de Promoção de Crescimento, foram também explorados neste trabalho, realizados não só para avaliação dos meios de cultura, onde foi possível analisar os requisitos e resultados obtidos, como também para validação de metodologias, nomeadamente, na validação de meios e fluidos de marcas diferentes para utilização no método STERITEST e na validação do método de filtração de membrana para Enumeração Microbiana de um produto não estéril. Estas validações possibilitaram a redução de custos e melhoria das condições da análise e metodologias aplicadas.

Com a realização do estágio foi possível adquirir aptidões práticas, que aliadas ao conhecimento teórico obtido no mestrado, proporcionaram um crescimento a nível pessoal, científico e profissional.

**Palavras-chave:** Indústria Farmacêutica; Controlo de Qualidade Microbiológica; Áreas de Processamento Asséptico; Testes de Esterilidade; Testes de Promoção de Crescimento; Validação de Métodos.



## **Abstract**

This internship Report aimed to analyze and discuss the skills acquired and developed during the internship in microbiological quality control in the pharmaceutical industry, the internship was performed at the Microbiology Laboratory of Laboratórios Atral, AtralCipan Group, located in Vala do Carregado, Castanheira do Ribatejo. The work lasted about ten and a half months, from September 21<sup>th</sup>, 2011 to August 10<sup>th</sup>, 2012.

At an early stage, were acquired the skills necessary for the application of the methodologies performed in the laboratory of Microbiology, with the study of standards, procedures and legislation, focusing on the importance of the pharmacopoeia in the pharmaceutical industry and with the training for conducting tests on Aseptic Processing Areas, knowing and understanding the procedure required.

One of the main methodologies carried out and developed in this report included the analysis of sterile pharmaceutical products, with the application of sterility tests, by the STERITEST method and direct method, with results that established the importance of these techniques, the environment evaluation in which they are carried out, and the operator that performs them.

Growth Promotion Tests, were also explored in this work, performed not only for the evaluation of culture media, where it was possible to analyze the requirements and results obtained, but also for method validation, including, validation of different brands of media and fluids, for use in the STERITEST method and validation of membrane filtration method for microbial enumeration of a non-sterile product. These validations have enabled costs reduction and improvement of analysis conditions and methodologies.

With this internship it was possible to acquire practical skills, which together with the theoretical knowledge obtained in the master course, provided a personal, professional and scientific growth.

**Keywords:** Pharmaceutical Industry; Microbiological quality control; Aseptic Processing Areas; Sterility tests; Growth Promotion tests; Method validation.



# Índice

## **INTRODUÇÃO** **1**

---

### **CAPÍTULO I**

#### **A EMPRESA E PERCURSO REALIZADO** **5**

---

1.1 – Caracterização da Empresa	7
1.1.1 – Laboratórios Atral	8
1.1.2 – Laboratório de Microbiologia	9
1.2 – Primeiros Passos	10
1.2.1 – Normas, Procedimentos e Legislação aplicada	10
1.2.2 – Áreas de Processamento Asséptico - APA	10
1.2.2.1 – A entrada/saída de materiais e higienização	11
1.2.2.2 – Fardamento	12
1.2.2.3 – Monitorização ambiental dos ensaios	13
1.3 – Actividades desenvolvidas	15
1.3.1 - Análise microbiológica de Água Purificada	15
1.3.2 - Detecção de Endotoxinas bacterianas	15
1.3.3 - Avaliação Microbiológica de Produtos Não Estéreis	16
1.3.4 - Identificação de microrganismos	16

### **CAPÍTULO II**

#### **TESTES DE ESTERILIDADE** **17**

---

2.1 – Revisão Bibliográfica	19
2.1.1 – Teste de Esterilidade	20
2.1.2 – Meios de cultura, Diluentes, Tempo e Temperatura de incubação	24
2.1.3 – Controlo no Teste de Esterilidade	24
2.1.4 – Interpretação dos resultados	25
2.1.5 – Limitações	26
2.1.6 – Métodos Alternativos	26

2.1.7 – A aplicação do Teste de Esterilidade nos Laboratórios Atral	27
2.1.8 – Trabalho desenvolvido durante o estágio	27
2.2 – Metodologia	28
2.2.1 – Método de Filtração de Membrana - STERITEST	28
2.2.1.1 – STERITEST – Análise de rotina de produtos estéreis solúveis	29
2.2.2 – Método Directo	30
2.2.2.1 – Método directo – Análise de Rolhas e Cápsulas	30
2.3 – Análise e Discussão dos Resultados	31
2.3.1 – Método por Filtração por Membrana - STERITEST	31
2.3.1.1 – STERITEST – Análise de rotina de produtos estéreis solúveis	32
2.3.2 – Teste de Esterilidade – Método Directo	38
2.3.2.1 – Método directo – Análise de rotina a Rolhas e Cápsulas	38

### **CAPÍTULO III**

#### **TESTES DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO** **41**

---

3.1 – Revisão Bibliográfica	43
3.1.1 – O Método	44
3.1.1.1 – Promoção de Crescimento	45
3.1.1.2 – Propriedades Indicativas e Inibitórias	46
3.1.2 – Estirpes utilizadas	46
3.1.3 – Controlos	47
3.1.4 – A utilização dos Testes de Promoção de Crescimento em Validações	48
3.1.5 – A aplicação do Teste de Promoção de Crescimento nos Laboratórios Atral	49
3.1.6 – Trabalho desenvolvido durante o estágio	50
3.2 – Metodologia	51
3.2.1 – Teste de Promoção de Crescimento – Meios de Cultura	51
3.2.1.1 – Preparação da Suspensão de Microrganismos	52
3.2.1.2 – Inoculação nas placas de controlo e meios de cultura a testar	53

3.2.2 – Validação de Meios e Fluido para ensaio de esterilidade – STERITEST	54
3.2.3 – Validação do Procedimento para avaliação microbiológica de produtos não estéreis: Caso de estudo - Testes de Enumeração por Filtração por Membrana	56
3.2.3.1 – 1ª Fase - Análise microbiológica do Produto C: Testes de Enumeração e Pesquisa de <i>E. coli</i>	58
3.2.3.2 – 2ª Fase – Validação dos Testes de Enumeração do Produto C – Testes de Promoção de Crescimento	59
3.2.3.3 – 3ª Fase – Validação do Teste de Pesquisa de <i>E. coli</i> no Produto C – Testes de Promoção de Crescimento	59
3.2.4 – Teste de Avaliação da Recuperação dos lotes de pastilhas	60
3.2.4.1 – Preparação da Suspensão de Microrganismos	60
3.2.5.2 – Inoculação nas placas de controlo	60
3.3 – Análise e Discussão dos Resultados	61
3.3.1 – Teste de Promoção de Crescimento em meios de cultura	61
3.3.2 – Validação de Meios e Fluido para ensaio de esterilidade – STERITEST	70
3.3.3 – Validação do Procedimento para avaliação microbiológica de produtos não estéreis: Caso de estudo - Testes de Enumeração por Filtração por Membrana	73
3.3.4 – Teste de Avaliação da Recuperação dos lotes de pastilhas	77

---

**CONCLUSÃO** **81**

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** **87**

---

**ANEXOS** **93**

Anexo I – Resultados obtidos nas monitorizações ambientais dos Ensaio de Esterilidade efectuados na APA.	94
Anexo II – Propriedades Indicativas observadas nos Testes de Promoção de Crescimento aos meios de cultura selectivos.	97
Anexo III – Taxa de Recuperação das Pastilhas utilizadas nos Testes de Promoção de Crescimento.	99





## Índice de Abreviaturas, Acrónimos e Sinais

%	Percentagem
°C	Graus Célsius
h	Hora
g	Gramma
mg	Miligramma
n°	Número
mL	Mililitro
µL	Microlitro
IU	<i>International Unit</i> (Unidade Internacional)
APA	Áreas de Processamento Asséptico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CEA	<i>Cetrimide Agar</i>
CIP	<i>Collection of Institut Pasteur</i>
EP	<i>European Pharmacopoeia</i>
EudraLex	<i>The Rules Governing Medicinal Products In The European Union</i>
FP	Farmacopeia Portuguesa
FDA	<i>Food &amp; Drug Administration</i>
FTM	<i>Fluid Thioglycollate media</i>
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i> (Boas Práticas de Laboratório)
GMP	<i>Good manufacturing practice</i> (Boas Práticas de Fabrico)
MCA	<i>MacConkey agar</i>
MCB	<i>MacConkey broth</i>
MLB	<i>Lethen-Broth Base modified</i>
MOS	<i>MOSSEL broth</i>
MSA	<i>Mannitol Salt agar</i>
PIC/S	<i>Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme</i>
R2A	<i>Reasoner's 2A agar</i>
rpm	Rotações por minuto
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
TAMC	<i>Total aerobic microbial count</i> (Contagem microrganismos aeróbios totais)
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>

TYMC	<i>Total yeasts and moulds count</i> (Contagem de leveduras e bolores totais)
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
VRBG	<i>Violet Red Bile Glucose</i>
VRS broth	<i>Rappaport Vassiliadis Salmonella enrichment broth</i>
XLD	<i>Xylose lysine deoxycholate agar</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I:</b> Limites recomendados de contaminação microbiológica nas placas de monitorização ambiental das APA, atendendo à Classe.	14
<b>Tabela II:</b> Número de amostras por ensaio e quantidade de ensaios necessários por lote, em função do tipo de produto a analisar.	29
<b>Tabela III:</b> Leitura e evidência de contaminação dos meios de cultura no Método de Filtração por Membrana.	31
<b>Tabela IV:</b> Caracterização dos ensaios efectuados, quanto ao tipo de análise, ensaios realizados, produtos e lotes testados.	32
<b>Tabela V:</b> Caracterização dos ensaios efectuados pelo Método Directo.	39
<b>Tabela VI:</b> Estirpes que podem ser utilizadas nos Testes de Promoção de Crescimento, segundo EP (2011) e USP (2012).	46
<b>Tabela VII:</b> Microrganismos e respectivos lotes utilizados nos Testes de Promoção de Crescimento, efectuados ao longo do estágio.	52
<b>Tabela VIII:</b> Microrganismos, inóculo e condições de incubação para o teste de promoção de crescimento de meios não selectivos utilizados: nos Testes de Enumeração para produtos não estéreis, no controlo ambiental; na avaliação microbiológica da água purificada.	53
<b>Tabela IX:</b> Microrganismos, inóculo e condições de incubação para o Teste de Promoção de Crescimento dos meios não selectivo utilizados nos Testes de Esterilidade.	53
<b>Tabela X:</b> Microrganismos, inóculo e condições de incubação para o Teste de Promoção de Crescimento dos meios selectivos: utilizados nos Testes de Pesquisa de Microrganismos Específicos para produtos não estéreis.	54
<b>Tabela XI:</b> Lote de microrganismos, inóculo e controlos utilizados para validação do Fluido D e meios TSB e FTM.	55
<b>Tabela XII:</b> Preparação da amostra, métodos utilizados e resultados obtidos na análise microbiológica do Produto C.	56
<b>Tabela XIII:</b> Lote de microrganismos, inóculo e controlos, utilizados para validação dos Testes de Enumeração (TAMC e TYMC) e do Teste de Pesquisa de <i>E. coli</i> .	57
<b>Tabela XIX:</b> Preparação da suspensão e inóculos para avaliação da recuperação do lote de pastilhas.	60

<b>Tabela XX:</b> Critérios necessários para conformidade dos testes nos lotes de meios de cultura não selectivos: utilizados nos Testes de Enumeração para produtos não estéreis, no controlo ambiental; e nos Testes de Esterilidade.	62
<b>Tabela XXI:</b> Critérios necessários para conformidade dos lotes de meios de cultura selectivos utilizados nos Testes de Pesquisa de Microrganismos Específicos para produtos não estéreis.	62
<b>Tabela XXII:</b> Número total de ensaios e quantidade de lotes utilizados de microrganismos.	63
<b>Tabela XXIII:</b> Resultados obtidos nos Testes de Promoção de Crescimento. Microrganismos necessários para a validação do lote, total de lotes testados.	64
<b>Tabela XXIV:</b> Resultados obtidos nos Testes de Promoção de Crescimento para validação dos meios de cultura e fluido D por STERITEST com o Produto A.	71
<b>Tabela XXV:</b> Resultados obtidos nos testes de promoção de crescimento para validação dos meios de cultura e fluido D por STERITEST com o Produto B.	71
<b>Tabela XXVI:</b> Preparação da amostra, métodos utilizados e resultados obtidos na análise microbiológica do Produto C, utilizando o método de filtração por membrana para Enumeração Microbiológica – 1ª Fase.	73
<b>Tabela XXVII:</b> Resultados obtidos nos Testes de Promoção de Crescimento para validação do método de filtração por membrana nos Testes de Enumeração do Produto C – 2ª Fase.	74
<b>Tabela XXVIII:</b> Resultados obtidos nos testes de promoção de crescimento para validação do método utilizado na pesquisa de <i>E. coli</i> no Produto C – 3ª Fase.	76
<b>Tabela XXIX:</b> Resultados obtidos nos Testes de Avaliação da Recuperação dos lotes de pastilhas de <i>S.aureus</i> (2534), <i>P. aeruginosa</i> (2500) e <i>A. brasiliensis</i> (2541). A azul, UFC alvo escolhido, atendendo aos resultados obtidos nos ensaios.	77
<b>Tabela A.I:</b> Monitorizações de fardamento, superfície e ar (por sedimentação) das sessões na APA com Ensaios de Esterilidade por STERITEST.	94
<b>Tabela A.II:</b> Monitorizações de fardamento, superfície e ar (por sedimentação) das sessões na APA com Ensaios de Esterilidade pelo Método Directo.	96
<b>Tabela A.III:</b> Taxa de Recuperação das pastilhas das estirpes utilizadas nos Testes de Promoção de Crescimento, fracção entre a média de UFC nas placas de controlo como o inóculo alvo (calculado com base no número de UFC por pastilha que vem no certificado). Total de pastilhas utilizadas, média e desvio padrão das Taxas de Recuperação por lote.	98

## Índice de Figuras

<b>Figura I:</b> Organização do Grupo AtralCipan.	7
<b>Figura II:</b> Fardamento utilizado na APA.	12
<b>Figura III:</b> Monitorização efectuada à APA no fim da Sessão.	14
<b>Figura IV:</b> Sistema Steritest™ Compact.	22
<b>Figura V:</b> Sterisolutest™ EZ Device.	22
<b>Figura VI:</b> Teste de Promoção de Crescimento em FTM.	67
<b>Figura VII:</b> Teste de Promoção de Crescimento de CEA.	69
<b>Figura VIII:</b> Teste de Promoção de Crescimento de MCB.	69
<b>Figura A.I:</b> Teste de Promoção de Crescimento e de Propriedades Indicativas em MSA.	97
<b>Figura A.II:</b> Teste de Promoção de Crescimento e de Propriedades Indicativas em MCA.	97
<b>Figura A.III:</b> Teste de Promoção de Crescimento e de Propriedades Indicativas em VRBG.	98

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico I:</b> Distribuição de ensaios pelas sessões efectuadas na APA.	32
<b>Gráfico II:</b> Monitorização do fardamento das sessões nas APA.	35
<b>Gráfico III:</b> Monitorização Ambiental das sessões nas APA	37
<b>Gráfico IV:</b> Média e desvio padrão das taxas de Recuperação obtidas em função do microrganismo, no total de lotes de TSA de sedimentação e TSA de Contacto, testados e conformes.	65
<b>Gráfico V:</b> Média e desvio padrão das taxas de Recuperação obtidas em função do microrganismo, no total de lotes de SDA e R2A, testados e conformes.	65
<b>Gráfico VI:</b> Comparação das taxas de Recuperação obtidas na 2ª fase da Validação do método de filtração por membrana para Testes de Enumeração.	75
<b>Gráfico VII:</b> Média e desvio padrão das taxas de Recuperação dos lotes de pastilhas, nos ensaios em que foram utilizadas.	78



## **INTRODUÇÃO**





A Microbiologia Farmacêutica é um ramo aplicado da microbiologia, ligado à indústria farmacêutica, responsável por muitos dos principais objectivos de garantia da segurança do paciente e da qualidade do produto, desde o controlo de qualidade, desenvolvimento de produtos e métodos, produção e estabilidade. (Sutton e Singer, 2011)

Uma área fundamental da microbiologia farmacêutica é o controlo de qualidade, pelo estudo dos microrganismos contaminantes, associados à produção de produtos farmacêuticos, uma vez que, a contaminação microbiológica torna-se um problema quando resulta em efeitos indesejáveis aquando da utilização desses produtos. Esta preocupação diz respeito tanto a produtos farmacêuticos estéreis com não estéreis, e por isso, a microbiologia farmacêutica está envolvida: na compreensão da probabilidade do aumento de contaminações no produto, procurando formas de minimizar essas contaminações; no desenvolvimento de métodos de detecção de contaminações; e na compreensão da severidade dos efeitos destas, sendo para isso, necessário perceber o tipo de produto, o seu propósito e a natureza e número de contaminantes.

Existe um risco significativo quando se encontra contaminação microbiológica em produtos injectáveis, enquanto que em produtos não estéreis (com comprimidos, líquidos orais, cremes, etc.), a maior preocupação prende-se na ausência de microrganismos específicos, como *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A microbiologia farmacêutica, foca-se também nas monitorizações do ambiente em que o produto é fabricado, dados que indicam se as salas limpas estão a operar correctamente, se a limpeza efectuada é eficiente e se os operadores estão a executar, de forma correcta, as suas actividades. (Sandle, 2012)

Com o intuito de aprofundar o conhecimento na área da microbiologia farmacêutica, foi realizado este estágio, que decorreu no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Controlo de Qualidade dos Laboratórios Atral, Grupo AtralCipan, um grupo farmacêutico dedicado à produção de princípios activos e especialidades farmacêuticas. O estágio teve a duração de aproximadamente dez meses e meio, com início a 21 de Setembro de 2011 e fim a 10 de Agosto de 2012.

Este estágio teve como principal objectivo, adquirir conhecimentos teóricos e práticos, no controlo de qualidade microbiológica realizado na indústria farmacêutica, dando também um contributo pessoal à empresa, com a análise do trabalho realizado.

São por isso definidos, os seguintes objectivos:

- Adquirir aptidões práticas nas várias metodologias utilizadas no controlo de qualidade de produtos farmacêuticos;
- Conhecer e interpretar as normas e requisitos necessários à realização dessas metodologias;
- Com base nos resultados encontrados, procurar e discutir possíveis alterações para melhoria dos procedimentos efectuados.

O presente relatório de estágio, encontra-se organizado em três capítulos:

→ Capítulo I – Onde é apresentada a empresa e o laboratório onde o estágio foi realizado e onde são descritos e discutidos os primeiros passos dados neste percurso, bem como as metodologias aplicadas.

→ Capítulo II – Onde é apresentada uma das principais actividades desenvolvidas – Testes de Esterilidade, com revisão bibliográfica sobre o tema, metodologias realizadas e discussão dos resultados obtidos.

→ Capítulo III – Com a exposição de outra actividade desenvolvida – Testes de Promoção de Crescimento, com revisão bibliográfica, metodologias e diferentes aplicações destas e discussão dos resultados obtidos.

São apresentadas no final, de um modo sucinto, as conclusões gerais das actividades desenvolvidas, bem como uma opinião crítica relativamente ao trabalho realizado.

## **CAPÍTULO I**

### **A EMPRESA E PERCURSO REALIZADO**



## 1.1 – CARACTERIZAÇÃO DA EMPRESA

A AtralCipan é um grupo químico-farmacêutico integrado no mercado mundial, considerado actualmente a quarta maior exportadora de produtos farmacêuticos. (Marcelino, 2012) Situada na Vala do Carregado, o grupo tem como missão desenvolver produzir e comercializar substâncias activas, medicamentos, produtos de saúde e bem-estar que contribuam para a melhoria da qualidade de vida. Visa ser em 2015, o maior e o melhor grupo químico-farmacêutico português do mercado nacional e internacional, reconhecido como parceiro científico, tecnológico e comercial de excelência. (AtralCipan, site oficial)

O Atral, fundado pelo Comendador Sebastião Alves, iniciou a sua actividade em 1947, começando por ser uma modesta farmácia situada em Alcântara, Lisboa. Após a aprovação das instalações fabris, pela Food & Drug Administration (FDA), a empresa mudou-se para a Vala do Carregado, na Castanheira do Ribatejo e foi reestruturada pela parceria criada com a empresa Cipan, nascendo assim o Grupo AtralCipan, que em 1963, inicia produção autónoma de três fármacos (tetraciclina, oxitetraciclina e eritromicina) inéditos no mercado nacional.



**Figura I:** Organização do Grupo AtralCipan (retirado do site oficial do Grupo, [www.atral.pt](http://www.atral.pt)): Empresas integradas no grupo: Atral, Cipan, Prinmon, Vida, GSfarma, Mediquímica e Mediscript.

Após esta união, o AtralCipan tornou-se numa das maiores indústrias produtoras de princípios activos e de especialidades farmacêuticas, exportando vários produtos e fornecendo grande parte do mercado, pelo desenvolvimento de diferentes áreas de competências tecnológicas, apoiadas por recursos humanos multidisciplinares. Hoje em dia, existem 7 empresas integradas no grupo, constituindo assim uma polivalência em produtos e tecnologia. (Figura I)

### **1.1.1 – Laboratórios Atral**

O Atral, com laboratórios próprios, dedica-se à produção, controlo de qualidade e desenvolvimento de diversos fármacos, seguindo os requisitos de Boas Práticas de Fabrico (GMPs, *Good Manufacturing Practice*), baseados nas GMPs europeias – Eudralex (2008).

As GMPs são a parte da garantia de qualidade que assegura que os produtos são produzidos e controlados com padrões de referência adequados, dizendo respeito não só à produção mas também ao controlo de qualidade. O controlo de qualidade trata da amostragem, especificações e ensaios. Trata também da organização, documentação e procedimentos que asseguram que nenhum dos materiais a utilizar no fabrico e que nenhum dos medicamentos aprovados para venda ou distribuição serão dispensados, até que a sua qualidade seja satisfatória. (Eudalex, 2012)

O Departamento de Controlo de Qualidade dos Laboratórios Atral engloba o Laboratório Químico e o Laboratório de Microbiologia, responsáveis pelo controlo de qualidade, seguindo o requerido no Estatuto do Medicamento (Decreto-Lei n.º 176/2006) pela aplicação de todas as monografias, incluindo monografias e capítulos gerais da Farmacopeia Portuguesa (FP) e da Europeia (EP) em conformidade com as disposições relacionadas com as Boas Práticas de Laboratório (GLPs, *Good Laboratory Practice*) estabelecidas no Decreto-Lei n.º 99/2000, de 30 de Maio, respeitante à aplicação dos princípios de GLP e ao controlo da sua aplicação aos ensaios sobre as substâncias químicas.

**1.1.2 – Laboratório de Microbiologia**

O Laboratório de Microbiologia é responsável pelo controlo que qualidade microbiológica de águas, matéria-prima, materiais de embalagem, produto acabado e ambiente das Áreas de Processamento Asséptico (APA) de produção e existentes no laboratório.

As instalações estão organizadas de acordo com as normas de GLPs: com uma sala de preparação de meios de cultura e reagentes; sala de preparação de material, onde se processa à esterilização de meios, reagentes e preparação e esterilização de materiais e fardamento; sala de estufas, onde se encontram as estufas utilizadas para incubação dos meios de cultura, sala de manuseamento de estirpes, onde são realizados os doseamento microbiológicos, Testes de Promoção de Crescimento e de identificação de microrganismos; sala de ensaios de endotoxinas, onde são realizados os ensaios de endotoxinas bacterianas; e três APA, duas onde se executam os testes de esterilidade para a análises de produtos estéreis, e uma, onde são realizados os ensaios de análise de produtos não estéreis e água purificada.

## **1.2 – PRIMEIROS PASSOS**

A fase inicial do estágio compreendeu etapas importantes, que permitiram a compreensão e a aquisição de competências necessárias para a realização das actividades pertencentes ao Laboratório de Microbiologia.

### **1.2.1 – Normas, Procedimentos e Legislação aplicada**

Primeiramente, foi dado a conhecer as normas e procedimentos da empresa, nomeadamente, o conceito de zona nas instalações fabris e o fardamento e higiene nessas zonas, permitindo a compreensão das várias zonas existentes: Zonas Limpas, zonas de contacto directo com o produto (APA, existentes na produção e no Laboratório de Microbiologia), com procedimentos de utilização de fardamento e higiene próprios, (abordados em 1.2.2); Zonas Intermédias, zonas que não entram em contacto directo com o produto (onde está localizado o Departamento de Controlo de Qualidade) e onde se utiliza fardamento composto por T-shirt, Calças, Bata e Sapatos de Protecção de cor branca; e Zonas não Limpas (como casas de banho, vestiários de acesso à zona intermédia e zonas de contacto directo com o exterior).

Foram também providenciados, os vários procedimentos, instruções técnicas e protocolos do Laboratório de Microbiologia, dando a conhecer toda a organização, condutas e metodologias aplicadas no laboratório, bem como, a legislação por de trás destes, nomeadamente, as Farmacopeias de referência utilizadas pela empresa, *European Pharmacopoeia* (EP), da qual a Farmacopeia Portuguesa (FP) é baseada, e *United States Pharmacopoeia* (USP), que fornecem uma base legal e científica para o controlo de qualidade de medicamentos durante o processo de desenvolvimento e produção, estabelecendo a composição qualitativa e quantitativa e os ensaios a efectuar sobre os medicamentos, matérias-primas utilizadas na produção e intermediários de síntese.

### **1.2.2 – Áreas de Processamento Asséptico - APA**

As Áreas de Processamento Asséptico, são áreas limpas utilizadas no fabrico e análise de produtos estéreis, cujo acesso deve ser efectuado através de entradas pressurizadas para o pessoal, equipamento e materiais. Cada operação de fabrico e ensaio requer um nível de limpeza ambiental adequado, de modo a minimizar os riscos de contaminação do produto ou dos materiais manuseados. São classificadas segundo as características ambientais



requeridas, conforme a EN ISO 14644-1, que estabelece a concentração máxima permitida de partículas em suspensão para cada classe: Classe A, zona de operações de alto risco, geralmente proporcionado por um posto de trabalho com fluxo de ar laminar; Classe B, condições assépticas de preparação e enchimento (background para zona de nível A); e Classe C e D, áreas limpas para executar etapas menos críticas da produção de medicamentos estéreis (Eudralex, 2008)

Com já referido, no laboratório de Microbiologia existem três APA, duas para execução de Testes de Esterilidade e uma para execução de análises microbiológicas de produtos não estéreis e água purificada. Estas, são áreas de classe B, com câmara de fluxo laminar de classe A, onde são realizados os ensaios, requisito necessários para a execução de testes de esterilidade. (Eudralex, 2008 e WHO, 2011) Nestas áreas, as superfícies expostas devem ser lisas, contínuas e sem falhas para minimizar os riscos de acumulação e proliferação de partículas, permitindo a repetida aplicação e utilização de agentes de limpeza e desinfectantes adequados. Para reduzir a acumulação de poeiras e facilitar a limpeza não podem existir zonas inacessíveis e deve ser minimizada a existência de barreiras físicas. (PIC/S, PI014-3, 2007)

As APA são áreas cujo espaço interno e superfícies expostas são microbiologicamente controladas, sendo da responsabilidade do operador, que executa ensaios: a realização de procedimentos para a prevenção de contaminação do ambiente, aquando da entrada/saída de materiais, da higienização do espaço e no correcto fardamento; e a realização das monitorizações do ambiente, nomeadamente do ar, superfícies e fardamento. Assim, foi recebida inicialmente formação para a realização de ensaios nas APA.

### **1.2.2.1 – A entrada/saída de materiais e higienização**

A entrada e saída de materiais das APA é feita através de uma antecâmara (janela). A entrada de materiais é o processo que requer mais atenção, pois estes devem ser previamente esterilizados e embrulhados em camada tripla de papel ou prata. Aquando da colocação do material na janela, é retirada uma das camadas do invólucro e é feita a desinfecção com isopropanol 70%, permanecendo o material dentro da janela, durante aproximadamente 30 minutos. Antes de entrarem na APA, é retirado mais uma das camadas do invólucro, retirando apenas a último invólucro na câmara de fluxo laminar, quando necessária a sua utilização.

A higienização da responsabilidade do operador, é realizada antes e depois da realização do ensaio, com isopropanol 70%, às principais áreas de contacto (bancada, janela e câmara de fluxo laminar), sendo ainda realizada uma limpeza todas as sextas-feiras, com um desinfetante, que varia de semana para semana, para impedir a resistência dos microrganismos lá existentes, seguida por tratamento com formol.

### **1.2.2.2 – Fardamento**

O fardamento utilizado pelo operador para entrada na APA é muito importante, pois evita a contaminação do ambiente, materiais e amostras, minimizando a possibilidade de ocorrência de falsos positivos nos ensaios. Nos laboratórios Atral, é constituído por duas fardas, uma interna e outra externa, que são previamente esterilizadas e que só podem ser colocadas na antecâmara que dá entrada do operador para a APA (vestiário). (**Figura II**)



**Figura II:** Fardamento utilizado na APA: **(A)** Farda interior, composta por touca, máscara, camisa, calças, meias e 1º par de luvas; **(B)** Farda exterior, composta por capuz, macaco, botas de protecção e 2º par de luvas. A colocação das fardas é feita seguindo a ordem indicada na legenda, de cima para baixo, e é retirada pela ordem contrária, de baixo para cima.

Na colocação da farda alguns pontos muito importantes devem ser seguidos: ao iniciar a colocação da farda interior, é necessária uma correcta higienização das mãos e a colocação de protecção no cabelo e boca (touca e máscara estéreis); após colocação da farda interior são colocadas luvas estéreis, e só depois é iniciada a colocação da farda exterior; ambas as fardas não devem em momento algum tocar no chão, ou em qualquer outra superfície; e só após a colocação da farda exterior, e imediatamente antes da entrada na APA, é que é colocado o segundo par de luvas estéreis. Para o correcto fardamento é necessária prática, não descorando nunca das regras e cuidados estabelecidos.

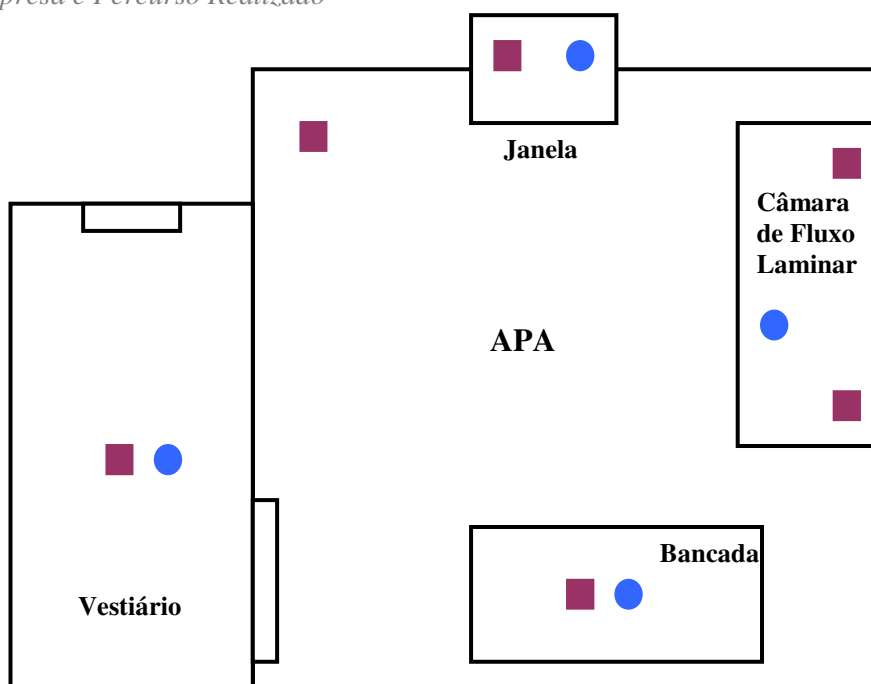
### **1.2.2.3 – Monitorização ambiental dos ensaios**

Todas as sessões realizadas nas APA têm que ser monitorizadas, sendo da responsabilidade do operador as monitorizações microbiológicas e a avaliação dos resultados. São efectuadas três monitorizações: monitorização do ar, por placas de sedimentação, e monitorização de superfícies e de fardamento, por placas de contacto.

É necessária a monitorização do ar, através da exposição de placas de sedimentação, colocadas, antes do início dos ensaios, em pontos específicos e que vão permitir avaliar as condições ambientais da APA, permanecendo expostas durante aproximadamente 4 horas. Já as monitorizações de superfícies, são executadas imediatamente após o ensaio, pelo contacto destas, com placas de contacto, durante 15 segundos aproximadamente. (**Figura III**) A monitorização do fardamento, é também efectuado após o ensaio, utilizando placas de contacto, como descrito para a monitorização das superfícies. As áreas avaliadas correspondem às zonas da boca, axilas, mãos, pulsos, peito, virilha e pés.

Por cada sessão realizada, apenas alguns pontos são monitorizados, de acordo com o cronograma semanal estabelecido pelo laboratório, sendo no entanto, efectuadas sempre monitorizações de ar e superfícies à câmara de fluxo laminar e à janela, bem como às luvas, no caso das monitorizações de fardamento. O meio TSA (Tryptic Soy Agar), de sedimentação e contacto, é o mais utilizado nas monitorizações ambientais (Stärk e Vogt, 2012), sendo o usado na empresa para monitorização ambiental da produção e dos ensaios realizados no laboratório.

Após as amostragens, as placas são incubadas 7 dias a 20-25°C e mais 7 dias a 30-35°C, estando, no Anexo I, do Eudrallex (2008), os limites recomendados de contaminação microbiológica nas placas, em função da Classe da área avaliada. (**Tabela I**)



**Figura III:** Monitorização efectuada à APA no fim da Sessão: ■ Locais onde se efectuam as monitorizações do ar, por placas de sedimentação, com tempo de exposição de aproximadamente 4 horas; ● Locais onde se efectuam as monitorizações das superfícies, por placas de contacto, expostas durante aproximadamente 15 segundos.

**Tabela I:** Limites recomendados de contaminação microbiológica nas placas de monitorização ambiental das APA, atendendo à Classe. (Eudralex, 2008)

Classe	Placas Sedimentação (diâmetro de 90 mm)	Placas de contacto (diâmetro de 55 mm)	Impressão de luva de 5 dedos
	UFC/4 horas	UFC/placa	UFC/luva
<b>A</b>	<1	<1	<1
<b>B</b>	5	5	5
<b>C</b>	50	25	-
<b>D</b>	100	50	-

### **1.3 – ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS**

As principais actividades desenvolvidas compreenderam os Testes de Esterilidade, com aplicação de dois métodos, o método de STERITEST e método directo, e a execução de Testes de Promoção de Crescimento para controlo de qualidade dos meios de cultura utilizados e para validação de metodologias, com a responsabilidade de preparação, execução e análise dos resultados, actividades que são discutidas mais detalhadamente nos **Capítulos II e III**, respectivamente. No entanto, foi também dado apoio a diversas actividades que permitiram contactar com as metodologias executadas no Laboratório de Microbiologia, enriquecendo esta experiência:

#### **1.3.1 - Análise microbiológica de Água Purificada**

A água purificada é um elemento muito importante na indústria farmacêutica e por isso, requer a análise química e microbiológica, que é feita periodicamente, como descrito na EP, 2010 em *Water Purified Monograph*. Para a análise microbiológica da água purificada é executada a filtração de um volume apropriado de água para enumeração de microrganismos totais, utilizando o meio R2A, que permite o desenvolvimento de microrganismos, sem a supressão de microrganismos de crescimento lento.

O apoio dado envolveu a validação de uma nova rampa de filtração, para a análise microbiológica de água purificada e a execução de testes preliminares para a validação do novo sistema de água purificada, o que possibilitou um maior conhecimento do método aplicado e a compreensão da importância e dos passos necessários para validações. Estas validações foram também muito importantes para a empresa, uma vez, que vieram alterar a metodologia utilizada, para uma mais simples, rápida e económica.

#### **1.3.2 - Detecção de Endotoxinas bacterianas**

As endotoxinas bacterianas, provenientes de bactérias Gram negativas, são as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos atribuídos à contaminação de medicamentos por pirogénios. A detecção de endotoxinas bacterianas, é executada em produtos estéreis e água para preparações injectáveis, empregando o método de gelificação, um método semi-quantitativo que utiliza lisado de amebócidos de *Limulus polyphemus*, que coagula na presença de determinada concentração de endotoxinas, com descrito na USP (2012) <85>.

Estes testes são executados por duas pessoas em conjunto e requerem muita concentração por parte dos operadores, por isso, a participação na realização destes testes mostrou a importância do trabalho de grupo e do rigor durante a execução desta técnica.

### **1.3.3 - Avaliação Microbiológica de Produtos Não Estéreis**

A avaliação microbiológica de produtos não estéreis (matéria-prima e produto final) permite verificar a presença ou ausência de microrganismos patogênicos e determinar o número de microrganismos viáveis, em função do tipo de utilização do produto, estando fixados pela EP (2011) em 5.1.4, os limites máximos de contaminação microbiana e os microrganismo a pesquisar. As metodologias utilizadas estão elaboradas com base no descrito na EP (2011) em 2.1.12, para testes de enumeração e 2.1.13 para testes de pesquisa de microrganismos específicos. Estes testes são executados em simultâneo, e no caso dos testes de pesquisa, os procedimentos necessários são efectuados ao longo de vários dias, por isso, a participação em alguns ensaios mostrou a importância do planeamento e análise das metodologias.

### **1.3.4 - Identificação de microrganismos**

Quando perante a presença de contaminação em produtos estéreis, na detecção de presumíveis microrganismos específicos nas análises a produtos não estéreis e no aparecimento de microrganismos nas placas de áreas de classe A, nas monitorizações ambientais, é necessária a sua identificação. Nos laboratórios Atral é feita a identificação de bactérias, onde após repicagem e isolamento das colónias, é feita a coloração de Gram, seguida pela identificação do género ou até à espécie, como exigido na USP (2012) em <1113>, por análise via Vitek® 2 Compact, um sistema automatizado de identificação, que utiliza cartas colorimétricas com 64 poços, contendo substratos para testes individuais, que são incubadas e interpretadas automaticamente. (Pincus, 2006) A execução dos testes de identificação permitiu aperfeiçoar a análise à coloração de Gram efectuada aquando da observação ao microscópio, e o contacto e familiarização com uma nova tecnologia para identificação de microrganismos.

Para além de todas estas metodologias, foi também dado apoio: na preparação e esterilização de meios, reagentes e materiais utilizados no laboratório e na análise dos resultados obtidos na monitorização das APA de produção.

## **CAPÍTULO II**

### **TESTES DE ESTERILIDADE**





## 2.1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Esterilidade, total ausência de microrganismos viáveis, é a característica mais importante e essencial quando se fala de produtos injectáveis. Estas formas farmacêuticas de administração parenteral, evitam muitas das defesas naturais do corpo, e se contaminadas podem levar a múltiplas complicações ao paciente já de si imunocomprometido. (Akers and Larrimore, 2003)

Como é referido na *European Pharmacopoeia* (EP, 2011) o teste de esterilidade é aplicado em substâncias, preparações e artigos para uso estéril, e permite verificar se estes se encontram livres de contaminação microbiológica pela incubação do produto, ou parte deste, num meio nutritivo. Publicado pela primeira vez na *British Pharmacopoeia* em 1932, desde então é um dos mais importantes testes de avaliação microbiológica. Inicialmente era apenas utilizado um método para avaliação da esterilidade, método directo, tendo em 1957 sido introduzido também o método de filtração por membrana. Sofreu poucas alterações desde 1960 e apesar de harmonizado em 2009, a metodologia essencial permanece inalterada. (Sandle, 2011)

Este teste é baseado no princípio de que ao inocular microrganismos num meio específico contendo os nutrientes necessários, por tempo e temperatura adequada, estes vão crescer e a sua presença pode ser identificada pelo aparecimento de turvação em meios originalmente límpidos. Assim um produto é considerado estéril se a amostra analisada passar os requisitos da EP (2011) e *Unites States Pharmacopoeia* (USP, 2012), seguindo os procedimentos indicados em 2.1.6 *Sterility* e <71> *Sterility tests*, respectivamente.

Esterilidade é um termo absoluto, ou algo é estéril ou não é, no entanto a esterilidade não pode ser comprovada, mas apenas avaliada em termos de probabilidade, porque apenas parte do lote produzido pode ser amostrado e analisado. Uma vez que é um método destrutivo, a conformidade do lote, é ditada com base nos resultados obtidos pela amostra, cuja produção foi efectuada nas mesmas condições, apresentando características homogéneas, e que se assume ser estatisticamente representativa. A quantidade de amostra a testar varia consoante o tipo de produto e a quantidade total deste no lote em estudo, encontrando-se tabelados na EP (2011) os valores mínimos de microrganismos para cada tipo de produto. Caso a amostra testada não passe os requisitos do teste, um novo teste só é

permitido se existir prova inequívoca de que isso se deveu ao operador ou a contaminação acidental. (Akers and Larrimore, 2003; Hugo and Russel, 1998)

No entanto, apesar do teste de esterilidade não assegurar a 100% a esterilidade de todo lote, dá à entidade reguladora, ao produtor e ao utilizador a indicação de que o lote não apresenta unidades contaminadas. É também um método que nos dá informação adicional sobre a eficiência dos processos de esterilização/assépsia utilizados no fabrico, não sendo no entanto, e como é referido pela USP (2012), projectado para esse efeito, mas apenas como um dos vários processos usados para garantir a esterilidade do produto. Até porque, a aprovação de um lote é feita também com base na avaliação de outros parâmetros de Garantia de Qualidade, como a monitorização ambiental da produção, observação das GMP e formação dos operadores. (Eudralex, 2008)

### **2.1.1 – Teste de Esterilidade**

A EP(2011) e USP(2012), em 2.1.6 *Sterility* e <71> *Sterility tests* respectivamente, descrevem dois métodos a utilizar para o Teste de Esterilidade, o Método Directo (inoculação directa) e o Método de Filtração por Membrana, considerando este último como o método preferencial, quando a sua execução é possível. Em ambos os métodos são utilizados dois meios de cultura para incubação das amostras: o meio FTM (Fluid Thioglycollate Media) e o meio TSB (Trypticase Soy Broth).

O Método Directo, é o método de escolha para análise de materiais estéreis, uma vez que permite o contacto directo do material com o meio de cultura, durante todo o tempo de incubação. A técnica consiste essencialmente em duas etapas: 1) a abertura asséptica das amostras a testar, de um lote de produto; 2) e a transferência, directa ou com a ajuda de algum utensílio estéril, dependendo do tipo de produto, de metade do volume requerido de cada amostra, para um tubo teste de FTM e para um tubo teste de TSB. Em teoria este método é bastante simples, mas difícil na prática. O operador que o executa, deve ter uma excelente mestria física e uma adequada atitude no que diz respeito ao cumprimento e conservação da esterilidade do ensaio, uma vez que, a repetição na abertura das amostras e transferência, pode causar fadiga e consequente distração, o que pode levar a uma maior incidência de contaminação acidental.

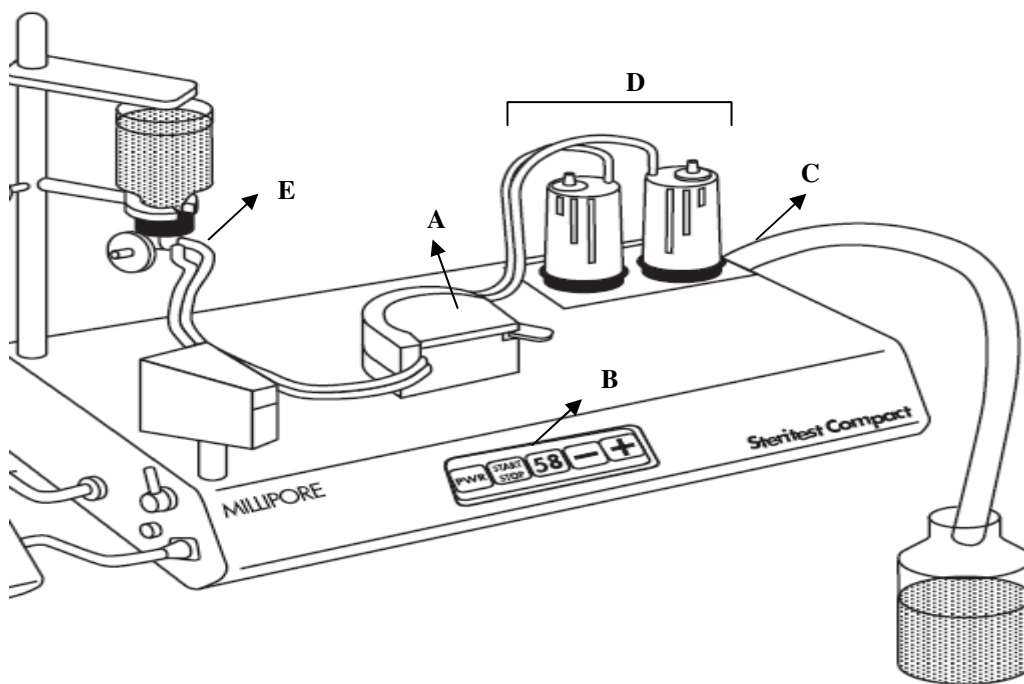
O Método de Filtração por Membrana, é o método de escolha para a análise de produtos farmacêuticos, e requer mais perícia e conhecimento, que o método Directo. Pode ser

dividido em cinco etapas: 1) montagem do sistema, com a colocação e humedecimento da membrana de filtração estéril; 2) transferência do conteúdo requerido de cada amostra, para o sistema (directamente ou após dissolução); 3) filtração e lavagem do conteúdo por vácuo; 4) remoção da membrana do sistema e corte desta, em duas metades; 5) e colocação de uma metade em meio FTM e a outra em meio TSB.

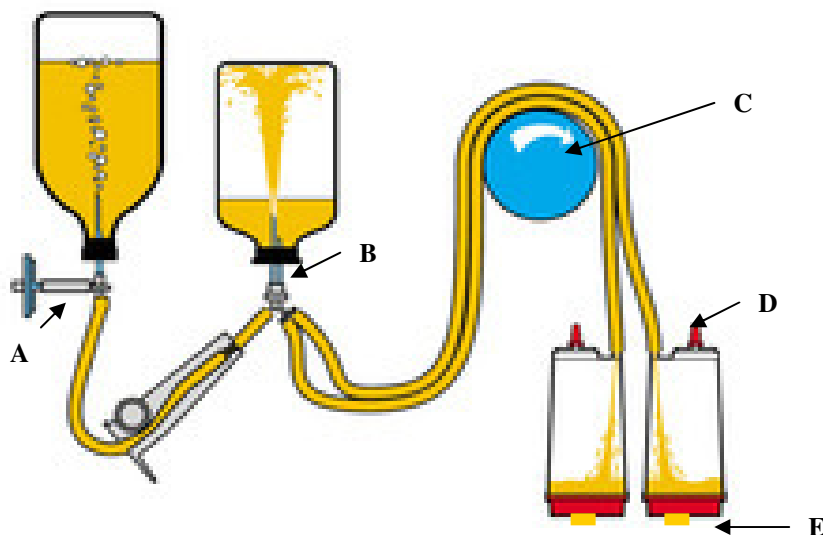
Este método, tem algumas vantagens quando comparado com o Método Directo: uma maior sensibilidade; menor probabilidade de incidência de falsos negativos, pela eliminação nas lavagens de agentes antimicrobianos presentes na amostra que possam inibir o crescimento dos microrganismos; a possibilidade de analisar grandes volumes de amostra num só teste; e a detecção de baixos níveis de contaminação, pela concentração destes na membrana. No entanto, apresenta também algumas desvantagens: pois existe uma maior probabilidade de contaminação accidental, por ser necessária uma maior aptidão do operador e um maior controlo ambiental aquando da manipulação (colocação, remoção, corte e transferência) da membrana; e pelo facto de o método ser incapaz de avaliar a incidência de contaminação nas amostras testadas de um mesmo lote, pois todas são filtradas por uma única membrana, que é cortada ao meio e colocada em TSB e FTM, correspondendo estes meios ao conjunto de todas as amostras analisadas, ao contrario do que acontece no método directo, em que cada amostra analisada corresponde a um meio de FTM e TSB (Akers and Larrimore, 2003 e Richter, 2011).

Nos últimos anos, o método de Filtração por Membrana tem sido bastante desenvolvido, tendo a Millipore criado o método STERITEST, utilizando o equipamento Steritest Compact (**Figura IV**). Na sua essência a metodologia é igual, tendo uma vasta aplicação em vários tipos de produtos, desde produtos farmacêuticos a dispositivos cirúrgicos. No entanto, o STERITEST, elimina uma das grande limitações do método de Filtração por Membrana tradicional, ao minimizar ao máximo a contaminação vinda do exterior, uma vez que todo o processo se dá em sistema fechado.

Trata-se de um circuito interno, através de tubagens isoladas, em que a transferência de produtos (amostras, meios de cultura e fluidos de lavagem) para os canisters, é conseguida pela perfuração dos septos incluídos nestes, pelas agulhas estéreis ligadas às tubagens. Os Canisters, são recipientes plásticos de utilização única, e que são utilizados em conjunto de dois, cada um destinado à incubação de um meio de cultura (FTM ou TSB).



**Figura IV:** Sistema Steritest™ Compact (retirado e adaptado de: Installation and Operation Manual, 2001, Millipore): A) Bomba e braçadeira; B) Painel de controlo, com controlo da rotação de bomba; C) Suporte de canisters com tubo de drenagem; D) Canisters; E) Tubagem com adaptadores de agulhas para inserção da amostra, diluente e meios.



**Figura V:** Sterisolutest™ EZ Device: (<http://www.millipore.com/catalogue/module/C10688>) Representação do circuito interno do STERITEST, ligação do diluente, amostra/meios aos canisters. A) Agulha Simples, para introdução de fluido na amostra; B) Agulha dupla, para introdução de fluido, amostra e meios nos canisters; C) Bomba, com rotação unidirecional; D) Tampões vermelhos, para ocorrer pressão de ar dentro dos canisters, são introduzidos para possibilitar a filtração da amostra; E) Tampões amarelos, para impedir passagem de liquido, utilizados no final da análise antes da introdução dos meios de cultura.

O equipamento é constituído por uma base que contém um suporte para os frascos, um suporte para colocar os canisters, com sistema de drenagem, e um bomba peristáltica de velocidade ajustável, à qual se vão ligar as tubagens. Assim, a introdução de líquido nos canisters é feita por bombeamento, através das tubagens, à velocidade desejada. (**Figura IV**)

Pelo método STERITEST, o produto é dissolvido e transferido directamente do frasco para os canisters, através das tubagens, onde é separado em duas porções iguais, sem exposição a contaminações ambientais (**Figura V**). Nos canisters, qualquer microrganismo presente nas amostras fica capturado pela membrana. Depois das lavagens com fluido, os meios FTM e TSB, são adicionados, um para cada canister, e incubados de modo a promover o crescimento desses microrganismos, de acordo com a EP (2011).

Independentemente do método utilizado para o Teste de Esterilidade, a PIC/S em PI 012-3 (2007) faz recomendações, algumas delas de extrema importância, no que diz respeito à execução dos ensaios:

- A esterilidade de um lote de produto só pode ser aferida, com a existência de um procedimento de amostragem estatisticamente válido, e por isso, o número de amostras a testar num ensaio, depende do número de unidades presentes no lote e do volume do frasco de cada amostra, para um produto em particular;
- O volume a testar por amostra deve ser suficiente para representar o volume total do frasco em que está contido;
- Quando um agente antimicrobiano faz parte de um produto a testar, a sua capacidade deve ser anulada durante os testes de esterilidade, de modo impedir a inibição do crescimento dos microrganismos contaminantes;
- Se um produto não pode ser filtrado, então inoculação directa, ou a combinação de outras técnicas, desde que validadas, são aceitáveis;
- Para precaução de contaminação accidental, um produto deve ser testado, em estritas condições de assepsia, como Áreas de Processamento Asséptico (APA) e câmaras de fluxo laminar.

### **2.1.2– Meios de cultura, Diluentes, Tempo e Temperatura de incubação**

Como já referido, dois meios de cultura, devem ser utilizados nos Testes de Esterilidade de produtos parenterais, descritos pela EP (2011) e USP (2012). Um deles, introduzido por Brewer em 1949, é o FTM (Fluid Thioglycollate Media), que proporciona tanto ambiente para o crescimento aeróbio, como anaeróbio, sendo considerado um bom meio para detecção de contaminação microbiana.

O outro meio é o TSB (Trypticase Soy Broth), que veio substituir o meio Sabouraud em 1970, e que promove o crescimento de fungos e bactérias. Tem um pH ligeiramente superior ao FTM, e é considerado um meio mais adequado para microrganismos aeróbios de crescimento lento.

Quando se utiliza o método de filtração por membrana, é necessário referir também a utilização de um diluente para dissolver produtos estéreis sólidos antes da filtração e para as lavagens da filtração. Este serve, para minimizar a destruição de pequenas populações de células vegetativas durante a dissolução e filtração das amostras. (Akers and Larrimore, 2003)

Ao longo dos anos, o tempo de incubação sofreu algumas alterações e tanto a USP como a EP, permitiram um período de 7 dias para testes por filtração por membrana. No entanto, vários estudos (Besajew, 1992 e Bathgate et al, 1993), mostraram que esse período era limitado e que não haviam diferenças significativas quanto à eficiência da detecção, com os 7 dias de incubação no método de filtração por membrana, mostraram também, que independentemente do método, uma proporção considerável de microrganismos não seria detectada. Actualmente, o tempo de incubação é de 14 dias, para o meio FTM a uma temperatura de 30-35°C e para o meio TSB de 20-25°C. Mas, mesmo com períodos mais longos de incubação, não há garantias de que todos os microrganismos conseguem crescer nestas condições, representando uma das maiores limitações dos métodos. (Moldenhauer and Sutton, 2004)

### **2.1.3 – Controlo no Teste de Esterilidade**

O controlo dos Testes de Esterilidade assenta sobre quatro pontos essenciais: a monitorização do ambiente em que o teste é executado; a monitorização do operador que o executa, o controlo positivo e o controlo negativo dos meios de cultura utilizados.

As monitorizações ambientais e do operador, como demonstrado no **Capítulo I**, são de extrema importância na avaliação final dos ensaios, e por isso o treino do operador deve ser controlado, quanto à sua compreensão, uso e atitude perante as rigorosas técnicas de assepsia necessárias. O controlo positivo dos meios de culturas, através de Testes de Promoção de Crescimento, como aprofundado no **Capítulo III**, permite assegurar, caso não se observe crescimento nos Testes de Esterilidade, que o crescimento ocorreria nos meios, se estivessem presentes microrganismos nas amostras testadas.

Segundo EP (2011) e USP (2012), o controlo positivo, deve ser feito por cada lote de meio, e o teste executado num ambiente separado, ao utilizado para o Teste de Esterilidade. Já os controlos negativos dos meios de cultura, permitem verificar a esterilidade destes sem a adição de produto, antes, durante e depois do período de incubação do Teste de Esterilidade. De acordo com a PIC/S em PI 012-3 (2007), meios representativos de um lote devem ser pré-incubados por 14 dias, à temperatura adequada, para demonstrar que se encontram estéreis, antes da sua utilização, ou em alternativa, o controlo negativo deve ser conduzido em simultâneo com o teste de esterilidade.

#### **2.1.4 – Interpretação dos resultados**

A detecção de contaminação dentro do período de incubação, dá-se com a observação de evidências de contaminação nos meios de cultura. Para isso, os meios, geralmente límpidos, deve ser observados à luz com regularidade, e o aparecimento de turvação, sedimentação ou outras evidências devem ser analisadas. Os meios suspeitos, no final do período de incubação, são testados para confirmação, pela transferência de uma porção para outro meio de cultura idêntico, e incubados nas mesmas condições durante 4 dias. Caso haja confirmação de contaminação, então esta deve ser identificada até ao género ou se possível até à espécie.

A EP (2011) e USP (2012), apenas permite repetição do ensaio caso existam evidências, que mostrem que a causa de não conformidade inicial se deveu ao laboratório. Assim, por cada Teste de Esterilidade positivo, é necessária uma investigação, de forma a determinar a sua validade. Esta investigação deve compreender: a avaliação das monitorizações ambientais nas APA e dos operadores, onde o teste é executado; avaliação dos dados sobre a esterilização dos meios, análise dos dados obtidos nos controlos e a análise de possíveis problemas que tenham ocorrido durante a execução.

Quando, no final do período de incubação, nenhum dos meios representativos, do lote testado, apresentam contaminação, o lote é considerado *Conforme* em termos de esterilidade. Caso se observe contaminação, num ensaio, que depois de avaliado é considerado válido, o lote é considerado *Não Conforme*. (PIC/S, PI 012-3, 2007; Richter, 2011)

### **2.1.5 – Limitações**

O Teste de Esterilidade, de acordo com o descrito actualmente na EP (2011) e USP (2012), apresenta três grandes limitações, óbvias desde a sua concepção: o longo período de tempo exigido para incubação da amostra; a incapacidade dos meios de culturas e dos tempos de incubação, promoverem o crescimento de todas as contaminações microbianas que possam existir numa amostra; e a impossibilidade de evitar possíveis contaminações acidentais das amostras.

Estas limitações podem, no entanto, ser reduzidas, e para isso é imperativo, a existência de condições ambientais favoráveis durante a produção e ensaios e também a formação dos operadores que executam o teste de esterilidade. Podem também ser aplicados, métodos alternativos que possibilitem a recolha de resultados num curto período de tempo e a detecção de microrganismos, que pelos métodos propostos pelas farmacopeias não são detectados.

### **2.1.6 – Métodos Alternativos**

Hoje em dia, é possível também, a utilização de métodos alternativos para execução de testes de esterilidade e outros testes de análise microbiológica na indústria farmacêutica, sendo especificado na USP(2012), em <1223>, os requisitos e procedimentos a seguir para a sua validação. A introdução de novos métodos, pode ser muito útil na eliminação de algumas das limitações existentes com a utilização dos métodos convencionais, principalmente na diminuição do tempo necessário para a obtenção de resultados. (Riley, 2004; Miller, 2011)

Os métodos microbiológicos rápidos disponíveis podem ser agrupados em duas categorias, os que necessitam de crescimento microbiano e os que não necessitam. No primeiro, estão incluídas técnicas como a detecção de adenosina trifosfato (ATP) por bioluminescência e a detecção colorimétrica da produção de CO<sub>2</sub>, entre outros. No segundo grupo, estão



tecnologias como polymerase chain reaction (PCR) e Citometria de fluxo. (Gray et al., 2011; Parveen et al.; 2011; Gordon et al., 2011; Sutton, 2005)

A aplicação de métodos alternativos que necessitam de crescimento, não resulta propriamente numa melhoria do método esterilidade, uma vez que microrganismos que já não cresçam nas condições de incubação indicadas, também não vão crescer com a aplicação deste método. Já os métodos que não requerem crescimento, têm a vantagem de conseguirem otimizar a detecção de todos os microrganismos presentes na amostra, independentemente das condições necessárias para o seu crescimento. (Moldenhauer and Sutton, 2004)

### **2.1.7 – A aplicação do Teste de Esterilidade nos Laboratórios Atral**

Nos Laboratórios Atral, o Teste de Esterilidade é utilizado na avaliação da esterilidade de uma vasta quantidade de produtos farmacêuticos estéreis, desde matéria-prima, produtos finais e produtos em estabilidades (produtos finais armazenados em diversas condições de armazenamento para avaliação da validade), e também materiais, utilizando os Métodos Directo ou Filtração por Membrana, consoante o item a analisar.

Para a análise de formas farmacêuticas estéreis solúveis, o método utilizado é o Método de Filtração por Membrana. Para formas farmacêuticas estéreis insolúveis e materiais estéreis, o método utilizado é o Método Directo e os meios de cultura utilizados são preparados em laboratório. Todos os ensaios de esterilidade são efectuados nas APA, com o respectivo controlo ambiental e do operador.

### **2.1.8 – Trabalho desenvolvido durante o estágio**

Durante o estágio, o trabalho desenvolvido com Testes de Esterilidade incidiu maioritariamente sobre a análise de produtos estéreis recorrendo ao método de filtração por membrana com o uso do STERITEST, utilizado em produto final e matéria-prima já validados para esses efeitos. Foi possível também, fazer a aplicação do método directo na análise de materiais utilizados na produção de produtos estéreis, como rolhas e cápsulas. Em ambas as situações, o objectivo principal da análise é a avaliação da esterilidade da amostra a testar.

## **2.2 – METODOLOGIA**

Todas as análises de rotina executadas para análise de produtos estéreis solúveis e materiais estéreis, foram realizadas em Áreas de Processamento asséptico (APA) onde se procedeu, por sessão, à monitorização ambiental, utilizando placas de sedimentação para amostragem do ar (TSA com neutralizadores); e de contacto (TSA: Count-Tact Agar), nas superfícies e fardamento, conforme o plano semanal de monitorizações e seguindo os procedimentos indicados no **Capítulo I**, bem como aos respectivos registos.

É necessário um Registo de Sessões, onde vem indicado o número da sessão e ano (ex: Sessão nº 123/2012) assinado pelo operador e onde se coloca a hora de entrada e saída da câmara APA; um Registo dos Ensaio efectuados nessa sessão, em que são registados os produtos analisados, bem como os lotes de reagentes e meios utilizados para cada, também assinados pelo operador. É na folha de registo de ensaios que são inseridas as observações diárias aos meios de cultura ao longo do tempo de incubação, e a apreciação final dos resultados, comentários referentes à execução do ensaio e resultados obtidos. Por fim, é também colocado em folha de registo própria, a Monitorização Ambiental e de Fardamento efectuada nessa sessão. Nesta folha são inicialmente indicados o número de sessão, data e hora de início e fim da amostragem, assinada pelo operador e findo o tempo de incubação das placas de monitorização, são registados os resultados obtidos e o respectivo lote e validade de placas utilizadas.

### **2.2.1 – Método de Filtração de Membrana - STERITEST**

Para a metodologia que se segue, na análise de rotina de produtos estéreis solúveis, utilizou-se o método STERITEST seguindo o procedimento interno: *Método STERITEST para ensaio de esterilidade*, que é baseado no procedimento da EP (2011) em 2.1.6 – *Sterility*.

Este método foi efectuado no equipamento Steritest Compact, com o respectivo suporte para Canisters com mangueira de drenagem, utilizando Canisters TZHVDV210 da Millipore, específicos para antibióticos solúveis e que possuem uma membrana do tipo PVDF (polyvinylidene fluoride) com um diâmetro máximo de poro de 0,45µm. Este tipo de membrana têm uma baixa adsorção que juntamente com a sua estrutura, permite uma melhor lavagem dos resíduos com actividade microbiana inibitória.

**2.2.1.1 – STERITEST – Análise de rotina de produtos estéreis solúveis**

Por cada ensaio, é utilizado um frasco de cada meio de cultura: TSB: Tryptic Soy Broth; e FTM: Fluid Thioglycollate Media, e a quantidade necessária de Fluido D: Rinse fluid, para dissolução das amostras e lavagens.

Preparação do meios de cultura, fluido e amostras: A quantidade de amostras a analisar, varia consoante o tipo de análise (**Tabela II**), e são transportadas para as APA mergulhadas em solução de Cloreto Benzalcónio (0,1%). Já na câmara de fluxo laminar, os septos das amostras, fluido e meios, por onde são introduzidas as agulhas do sistema, são limpos com Isopropanol 70%. Aos meios de cultura, TSB e FTM, são adicionados, com recurso a seringa e agulha estéril, uma quantidade validada de Penicilinase (10 000 000 IU/mL), consoante o produto a testar, para eliminação da Penicilina presente nas amostras.

**Tabela II:** Número de amostras por ensaio e quantidade de ensaios necessários por lote, em função do tipo de produto a analisar.

<b>Tipo de Análise</b>	<b>Nº de Amostras por Ensaio</b>	<b>Nº de ensaios por lote</b>
Produto Final	20	1 por cada dia de enchimento
Matéria-Prima	1	1 por embalagem
Estabilidades	20	1 por cada lote estabilidade

Humedecimento da membrana: Depois de montado o equipamento, o Fluido D é colocado na agulha dupla do sistema e aproximadamente 50 mL são bombeados para cada um dos canisters a uma velocidade de 45 rpm. Segue-se a filtração do conteúdo, deixando cerca de 25 mL em cada canister.

Filtração das amostras e lavagens: A uma velocidade de 30 rpm, o Fluido D é bombeado para a amostra, e esta por sua vez, depois de levada ao vortex para a total dissolução, é bombeada para os canisters (cerca de 300 mg, 150mg para cada canister). O processo é repetido para as vinte amostras, perfazendo um total de 6g filtrados, aproximadamente 3g para cada canister. São de seguida efectuadas 3 lavagens de 100mL por cada canister com Fluido D a uma velocidade de 50 rpm.

Adição dos meios de cultura e incubação: Por fim, o meio FTM é bombeado para um dos canisters e o meio TSB para o outro, a uma velocidade de 60 rpm, através da agulha dupla. Os canisters são selados, separados do sistema e incubados a 20-25°C e 30.35°C durante 14 dias respectivamente.

### **2.2.2 – Método Directo**

Para a metodologia que se segue, utilizou-se o Método Directo para análise de materiais utilizados em produtos estéreis (Rolhas e Cápsulas) e que não difere muito do utilizado para a análise de produtos estéreis insolúveis, baseando-se no procedimento da EP (2011) em 2.1.6 e de acordo com a monografia do produto a testar.

#### **2.2.2.1 – Método directo – Análise de Rolhas e Cápsulas**

A 10 tubos contendo 90 mL de FTM e a 10 balões com 80 mL de TSB, ambos preparados e esterilizados no laboratório, adicionou-se 1 rolha (ou cápsula) a testar, com o recurso a uma pinça estéril. Depois de agitados suavemente, os tubos e balões teste, bem com os respectivos brancos sujeitos às mesmas condições de ensaio, foram incubados a e 30.35°C e 20-25°C durante 14 dias respectivamente.

## 2.3 – ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Todos os testes de esterilidade de rotina foram executados nas APA, por isso, todos os ensaios realizados durante o estágio atenderam aos procedimentos de fardamento, entrada e higienização das APA (**Capítulo I**), bem como, aos registos obrigatórios, antes, durante e finda a análise, em função das sessões de entrada nas mesmas.

A análise de resultados não seria possível sem a realização destes registos. Estes, vão permitir comparar e avaliar todo o processo de análise, e não só o simples resultado Satisfatório/Não Satisfatório de uma amostra. Ao fazer os registos, é necessário ter em mente a sua importância e prestar a máxima atenção na sua redacção de modo a evitar erros, que podem comprometer um, ou até mesmo, vários ensaios.

### 2.3.1 – Método por Filtração por Membrana - STERITEST

Para analisar os resultados num ensaio, há que proceder à correcta leitura dos meios de cultura, para verificar se existem evidências de contaminação (**Tabela III**), que variam consoante os meios de cultura utilizados e amostra analisada. No método de filtração por membrana, tanto no tradicional como no STERITEST, os modos de leitura são iguais, sendo que no TSB a procura de evidências é feita com a agitação suave do meio permitindo evidenciar a presença de sedimentação, que aqui não pode ser confundida com presença de amostra, uma vez que esta é solúvel e eliminada no processo de filtração. Já na leitura do FTM, a agitação deve ser ao máximo evitada, pois fará com que a cinta vermelha presente no topo desapareça tornando todo o meio com uma coloração avermelhada.

**Tabela III:** Leitura e evidência de contaminação dos meios de cultura no Método de Filtração por Membrana.

Meios	Evidência de Contaminação microbiana	Leitura
<b>FTM</b>	Formação de aglomerados de colónias; Formação de películas na superfície do meio;	Desaparecimento da cinta vermelha <sup>a)</sup> À luz sem agitação.
<b>TSB</b>	Presença de Sedimentação; Presença de turvação no meio.	Presença de fibras soltas ou enoveladas como algodão. À luz agitando suavemente.

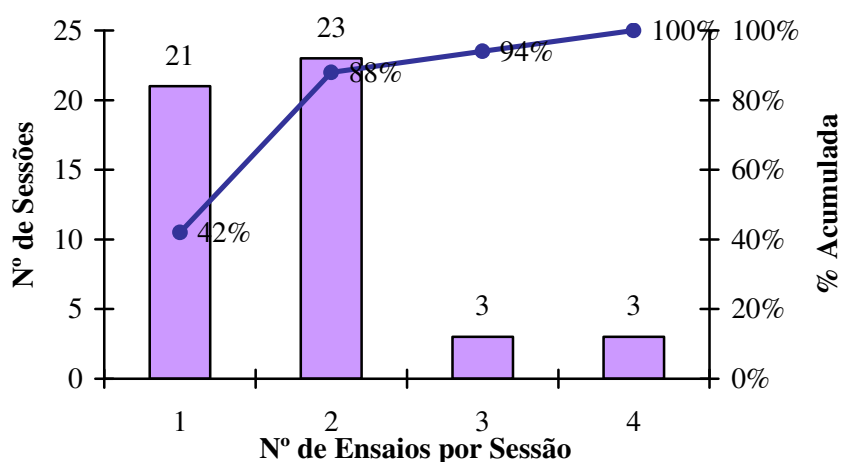
a) Pode não ocorrer, como demonstrado nos Testes de Promoção de Crescimento (*S. aureus*).

### 2.3.1.1 – STERITEST – Análise de rotina de produtos estéreis solúveis

Foram realizados, ao longo do estágio, um total de 88 ensaios de esterilidade pelo método STERITEST (Tabela IV), permitindo analisar 21 diferentes produtos farmacêuticos, num total de 37 lotes testados, num ou mais ensaios consoante o tipo de produto. A maioria dos ensaios serviram para testar produtos finais, onde cada ensaio corresponde a um dia de enchimento de um determinado lote de produto. A matéria-prima que foi testada, corresponde à que é utilizada na produção de produto final (se satisfatória em termos de esterilidade), onde o número de ensaios varia consoante o número de embalagens de um lote de matéria-prima. Foram também efectuados alguns ensaios de esterilidade a produtos em estabilidades. Estes, correspondem a lotes de um determinado produto final que são mantidos em condições específicas de tempo/temperatura/humidade e que permitem avaliar a esterilidade do produto durante o seu tempo de validade, em diferentes condições de armazenamento.

**Tabela IV:** Caracterização dos ensaios efectuados, quanto ao tipo de análise, ensaios realizados, produtos e lotes testados.

Tipo de Analise	Ensaio Realizados	Produtos	Lotes Testados	Ensaio Conformes	Ensaio não Conformes	Ensaio Anulados
<i>Produto Final</i>	57	14	28	56 (98%)	1 (2%)	0
<i>Matéria-prima</i>	17	5	5	17 (100%)	0	0
<i>Estabilidades</i>	14	2	4	10 (71%)	0	4 (29%)
<b>Total</b>	88	21	37	83 (94%)	1 (1%)	4 (5%)



**Gráfico I:** Distribuição de ensaios pelas sessões efectuadas na APA.

Os ensaios de esterilidade distribuíram-se ao longo de 50 sessões nas câmaras APA, e em 58% das sessões, foram realizados mais do que um ensaio (**Gráfico I**). Na sua maioria, por sessão são efectuados dois ensaios, pois cada ensaio demora em média 45 minutos, perfazendo um total de 2 horas, com o acréscimo do tempo gasto na preparação da câmara e das monitorizações. Só no caso das matérias primas, em que é utilizada apenas 1 amostra, reduzindo o tempo dissolução e filtração, foi possível fazer 3 e 4 ensaios.

O procedimento executado para o ensaio de esterilidade é igual para os diferentes produtos farmacêuticos testados. No entanto, tem que haver especial atenção à maneira de proceder aquando da dissolução e filtração das amostras. O volume de Fluido D utilizado na dissolução varia de amostra para amostra, não só dependendo da sua composição, mas também pela quantidade presente por frasco e pelo tamanho do frasco. Um dos cuidados passa por não deixar que o Fluido D, que é introduzido no frasco da amostra chegue à agulha do sistema, pois pode levar a que partes da amostra sejam sugadas pela bomba, directamente para os canisters, sem que estejam totalmente dissolvidas. Outro factor essencial está na quantidade de amostra dissolvida que vai para os canisters, que apesar de não ser exacta deve rondar as 150 mg de amostra para cada canister. Este processo deve ser o mais homogéneo possível entre ensaios, de modo a que, as diferenças entre ensaios de uma mesma forma farmacêutica sejam mínimas. Para isso, há que realçar a necessidade de treino por parte do operador antes de iniciar estes tipos de ensaios, para que a sua execução seja uniforme, de ensaio para ensaio, e assegurar que respeita as características das amostras que são analisadas.

Durante o tempo de incubação (14 dias), os meios são diariamente observados e o aparecimento de uma ou mais evidências de contaminação num, ou em ambos os meios de cultura, devem ser estudados para a confirmação de contaminação. Para que a amostra analisada seja considerada Satisfatória e um ensaio Conforme, nenhum dos meios deve apresentar quaisquer alterações, ao longo do tempo de incubação. Caso se verifique a presença de contaminação num meio de cultura, esta deve ser identificada, bem como o aparecimento de crescimento microbiano nas placas de classe A da monitorização ambiental de produção e da sessão, para avaliar a possível origem.

Dos ensaios efectuados, obteve-se um total de 94% de Conformes (**Tabela IV**). Este resultado, dá uma visão das boas práticas executadas pelos operadores envolvidos na produção e na análise de produto, pois, tendo em conta que estes produtos foram

previamente validados para a sua análise por STERITEST, a possibilidade de existência de falsos negativos é mínima. Apesar de ser um teste em sistema fechado, as boas práticas laboratoriais antes, durante e depois do ensaio não podem ser descuradas, pois um ou vários casos de ensaios não conformes podem muitas vezes não se dever ao produto em si mas sim ao operador que as efectua.

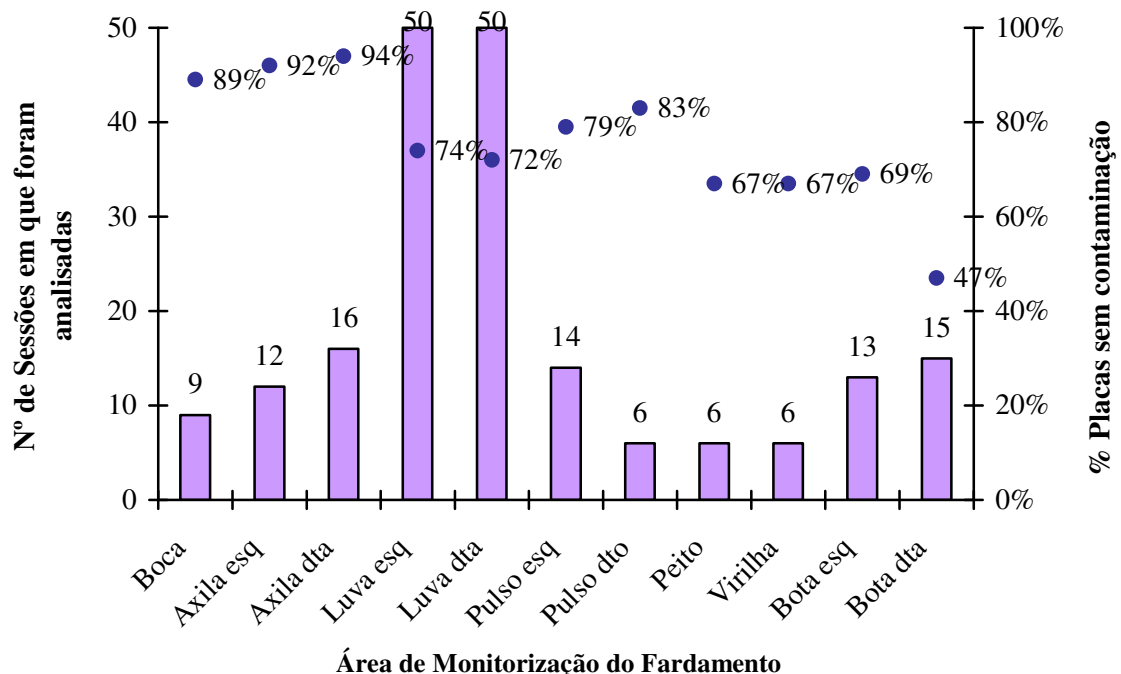
Apenas um ensaio deu *Não Conforme*, isto porque, se observou contaminação no meio TSB ao fim de 5 dias de incubação, com evidência de turvação e sedimentação. Para confirmação da contaminação, fez-se a repicagem e isolamento das colónias, coloração de Gram, tendo-se observado a presença de estreptobacilos Gram positivos, e posterior análise via VITEK® 2 Compact, sistema automatizado de identificação, onde se obteve um resultado de excelente, com confirmação do género e com 95% de probabilidade de se tratar de uma das seguintes espécies: *B. cereus*/*B. mycoides*/*B. thuringiensis*. Este resultado, mostra bem a importância dos Testes de Esterilidade nas formas farmacêuticas estéreis, uma vez que, este género produz endósporos (Brooks et al., 2007), que podem mais facilmente resistir aos processos de esterilização durante a produção, e sendo uma das possíveis espécies patogénica, se não detectada pode gerar consequências negativas no paciente, aquando da administração do produto.

À que referir ainda, a anulação de 4 ensaios de uma forma farmacêutica, nomeadamente na análise de estabilidades, onde não foi possível finalizar a análise por STERITEST, uma vez que, não se conseguiu filtrar as amostras na totalidade (**Tabela IV**). Mesmo depois de visualmente dissolvidas, ao nível microscópico as partículas formadas eram provavelmente superiores aos poros da membrana, entupindo-os e impedindo a filtração. Este facto, e tendo em conta que o produto foi previamente validado para esta técnica, pode dever-se às condições de degradação forçada, a que foi sujeito (tempo/temperatura/humidade) para avaliação de estabilidade. Nestes casos, procedeu-se à análise via filtração por membrana pelo método tradicional ou pelo método directo.

Como já referido, as monitorizações ambientais (ar e superfícies) e de fardamento são efectuadas por sessão e permitem avaliar as condições ambientais em que os ensaios são realizados, bem como, o operador que os efectua. Nos casos em que o ensaio é - *Não Conforme*, estas podem mesmo dar a indicação da origem de contaminação, caso esta provenha do ambiente ou operador.



Na monitorização de fardamento das sessões, em que se efectuou os ensaios de esterilidade acima referidos, foram amostradas 11 áreas da farda atendendo ao plano semanal de amostragem, imediatamente a seguir ao último ensaio realizado nessa sessão (**Anexo I, Tabela A.I**). Destas, duas áreas foram sempre amostradas, as luvas esquerda e direita, e que correspondem às áreas mais importantes quando se pensa em contaminações da amostra vinda do operador, por entrarem em contacto directo com os materiais e amostras (**Gráfico II**). A percentagem de placas sem contaminação, nestas áreas, foi de 74% para a luva esquerda e de 72% para a luva direita, valores que apesar de bons, podem ser melhorados, com adição de medidas antes e durante o ensaio. As luvas são colocadas imediatamente antes da entrada nas APA, não tendo muito contacto com o ambiente do vestiário. Já dentro das APA, são frequentemente higienizadas com Isopropanol 70%. No entanto, são também elas que entram em mais contacto com as várias áreas das APA, em especial, com a câmara de fluxo laminar e a janela de entrada de material. É no contacto com o ambiente da janela de material, uma ponte para meio exterior, que deve haver especial atenção, higienizando bem as luvas antes de se voltar a contactar com o ambiente do ensaio.

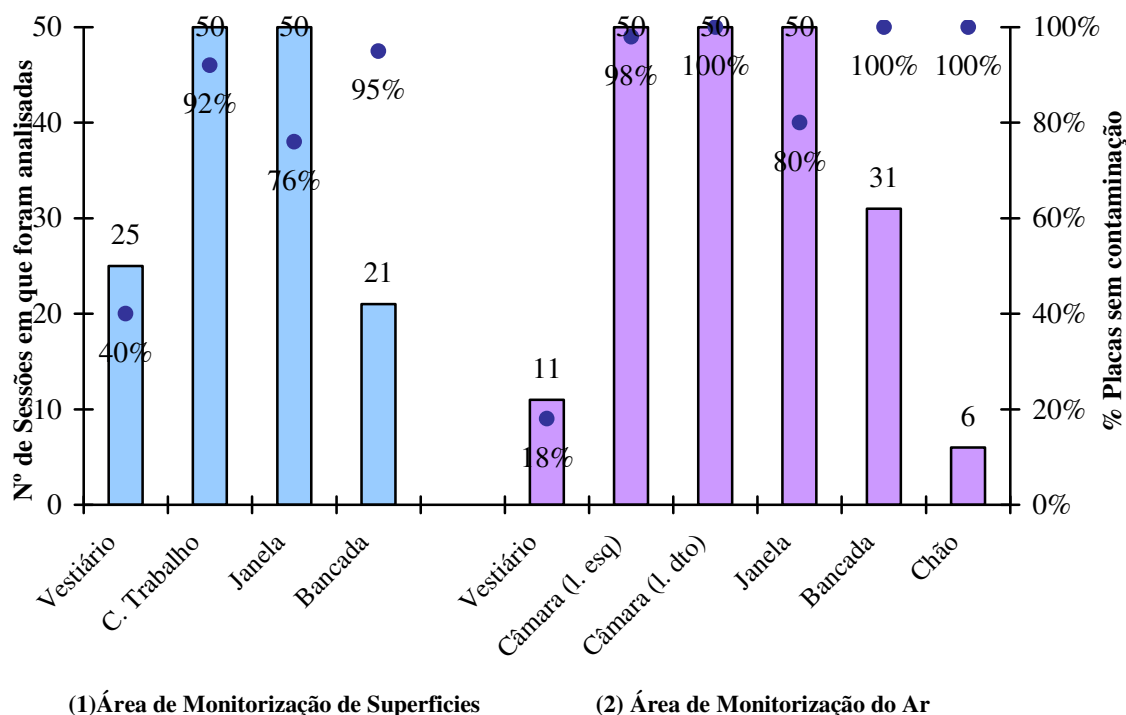


**Gráfico II:** Monitorização do fardamento nas sessões efectuadas para ensaios de STERITEST na APA, com o número de vezes que uma determinada área foi amostrada, bem como a percentagem de placas sem contaminação.

A percentagem de placas sem contaminação, foi maior nas áreas superiores da farda e o contrário aconteceu nas áreas inferiores, especialmente na bota direita onde só em 47% dos ensaios, em que foi analisada, apresentou placas sem contaminação (**Gráfico II**). À excepção das luvas, as áreas de fardamento, não contactam directamente com os materiais e amostras, mas são, as que nos dão mais informação sobre o processo de fardamento, sendo visível, que as falhas existentes, mesmo que mais influenciáveis pelo ambiente dentro do vestiário, situam-se nas áreas inferiores. É por isso também importante, evitar o contacto das luvas com o restante fardamento, pois parte das contaminações encontradas nestas, podem vir de um contacto accidental com algumas dessas áreas.

As monitorizações das superfícies, tal como no fardamento, foram efectuadas no final do último ensaio da sessão. Das quatro áreas de amostragem, a bancada de trabalho (local na câmara de fluxo laminar, onde se contacta mais durante o ensaio) e a janela de entrada de material, foram realizadas todas as sessões. Já as monitorizações ambientais por placas de sedimentação, foram amostradas pelo período de aproximadamente 4 horas, a contar desde o início do ensaio. Também aqui, as áreas amostradas em todos os ensaios foram a câmara de fluxo laminar (lado esquerdo e lado direito) e a janela (**Gráfico III**). Estas duas áreas são de extrema importância, a primeira, por ser o local onde se realiza o ensaio, servindo para avaliar o ambiente em que este é feito, e a segunda, por contactar tanto com o exterior como com o interior, sendo uma ponte entre ambos, na entrada e saída dos materiais. A frequência de contaminação nestas áreas foi muito baixa, indicando uma boa limpeza destas antes do ensaio. Mas, há que reforçar a importância da janela como fonte de contaminação das luvas e ambiente da APA, por isso deve-se evitar ao máximo o contacto com esta durante e entre ensaios.

A área do vestiário, em ambas as monitorizações, foi onde se observou uma maior frequência de placas contaminadas. Não só, é a área com contacto directo com o exterior e onde os operadores contactam antes de se fardarem, o que pode explicar os valores elevados, mas, é também a área de fardamento, o que pode justificar algumas das contaminações encontradas no fardamento, apesar dos cuidados utilizados durante o processo. É, por isso, uma área que deve ser bem higienizada e monitorizada com mais frequência.



**Gráfico III:** Monitorização Ambiental nas sessões efectuadas para ensaios de STERITEST nas APA, com o número de vezes que uma determinada área foi amostrada, bem como a percentagem de placas sem contaminação. (1) Áreas de Monitorizações de Superfícies por placas de contacto; (2) Monitorização do Ar por Placas de Sedimentação.

No geral, observa-se também que os resultados das monitorizações das superfícies apresentaram valores de contaminação superiores, quando comparadas com as monitorizações do ar, o que mostra a importância da higienização das superfícies, que está em maior contacto com o operador e materiais e onde à uma maior probabilidade de se encontrar microrganismos.

Para além de uma maior e mais cuidada higienização do operador e das áreas da APA, sugere-se a amostragem de algumas áreas em função do ensaio, em vez de ser em função das sessões. Isto porque, como já referido, na maioria das sessões são efectuados mais do que um ensaio, procedendo-se à higienização da câmara, dos materiais e a das mãos entre ensaios. Assim, a monitorização das luvas (fardamento) e da Câmara de Trabalho (superfícies) no final de cada ensaio, poderia avaliar melhor as condições existentes neste, e não, as existentes no fim dos 2 ou mais ensaios efectuados, detectando mais facilmente falsos positivos. Um exemplo disso, é o ensaio *Não Conforme* encontrado, onde foi possível identificar a contaminação da amostra. No entanto, na avaliação da monitorização ambiental e de fardamento dessa sessão não se encontraram placas contaminadas, pois as

amostragens de áreas de superfície e de fardamento foram só efectuadas no final do último ensaio dessa sessão, que não foi o ensaio em questão. Assim, apesar da estimativa ser válida, não se observando fonte de contaminação por parte do operador e ambiente, a monitorização das principais áreas de fardamento e superfície no final desse ensaio, poderiam ter avaliado melhor a influência destas.

Apesar das suas limitações, o método STERITEST, sendo um método em sistema fechado é mais seguro, quando comparado com o método tradicional, impedindo que muitas das influências ambientais e do operador, tenham interferência sobre os resultados. O que não quer dizer, que os cuidados a tomar devem ser descurados, mas apenas, que a probabilidade de contaminação accidental durante o ensaio é baixa.

### **2.3.2 – Teste de Esterilidade – Método Directo**

Para a análise dos resultados num ensaio por Método Directo é necessário ter atenção o tipo de amostra analisada. Neste caso, em que falamos de materiais, como rolhas e cápsulas, o modo de leitura e evidências de contaminação a procurar, é o mesmo que é utilizado para análise de resultados pelo Método de Filtração por Membrana (**Tabela III**). Já no Método Directo para análise de esterilidades de produtos insolúveis, seria necessário ter em atenção a visualização do meio de cultura TSB, pois a procura de evidências é feita sem agitação do meio para não confundir o produto sedimentado (que não é eliminado durante o ensaio) com uma possível contaminação.

#### **2.3.2.1 – Método directo – Análise de rotina a Rolhas e Cápsulas**

O procedimento efectuado para o ensaio de esterilidade por método directo é bastante simples e rápido, já os cuidados, quando comparado com o método STERITEST, têm que ser redobrados, pois aqui, há mais contacto com as amostras e meios de cultura. É necessária especial atenção, aquando da abertura dos meios e no manuseamento das amostras, de modo a evitar que toquem em algum local, ao serem transportadas com a pinça para o meio. O método directo para análise de materiais é, no entanto, mais fácil e rápido, quando comparado com a análise de produtos insolúveis. Nesses ensaios, a probabilidade de contaminação accidental por parte do operador e ambiente é superior, pois existem dois períodos de abertura dos meios, um para adicionar a penicilinase e outro para colocar a amostra, e as amostras, por sua vez, são abertas e adicionadas directamente ao

meio, ao contrário do que acontece no método STERITEST, onde se introduz a agulha do sistema na amostra, evitando o seu contacto com o exterior.

Para que a amostra analisada seja considerada *Satisfatória* e um ensaio *Conforme*, nenhum dos tubos e balões devem apresentar quaisquer alterações ao longo do tempo de incubação. Caso se verifique a presença de contaminação num único tubo ou balão de meio de cultura, esta dever ser identificada, bem como o aparecimento de crescimento microbiano nas placas de classe A da monitorização ambiental de produção e da sessão, para avaliar a possível origem. Durante o estágio foram apenas executados 5 ensaios pelo Método Directo ao longo de 3 sessões nas APA, todos com resultados satisfatórios (**Tabela V**). Já nas monitorizações efectuadas, encontrou-se apenas placas contaminadas na luva esquerda em (fardamento) e na janela (superfície e ar) em duas das sessões (**Anexo I, Figura A.II**).

**Tabela V:** Caracterização dos ensaios efectuados pelo Método Directo.

<b>Tipo de Material</b>	<b>Ensaio Realizados</b>	<b>Ensaio Conformes</b>	<b>Nº de Sessões</b>
<i>Rolhas</i>	4	4 (100%)	3
<i>Cápsulas</i>	1	1 (100%)	
<b>Total</b>	5	5 (100%)	

Quando comparado com o método STERITEST, a monitorização ambiental neste tipo de ensaio tem uma maior importância pois não se trata de um sistema fechado, havendo mais contacto do operador e ambiente, com os meios, amostras e materiais. Por isso, reforçando o que já foi mencionado, daria valorização à análise do ensaio, a monitorização de alguns pontos no final de cada ensaio e não só no final da sessão. Apesar de tudo, o Método Directo, mesmo sendo o método mais antigo, é bastante bom e continua hoje em dia a ter uma grande importância na indústria farmacêutica, sendo muitas vezes, o único que pode ser utilizado para ensaios de esterilidade de algumas formas farmacêuticas e materiais.

O Teste de Esterilidade, independentemente do método utilizado, só consegue atingir os objectivos, para os quais foi desenhado, com o emprego de medidas estritas, quanto à execução do método, controlo de monitorizações ambientais e do operador e numa correcta avaliação dos resultados obtidos.



## **CAPÍTULO III**

### **TESTES DE PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO**





### **3.1 – Revisão Bibliográfica**

Os meios de cultura microbiológicos baseiam-se na associação qualitativa e quantitativa de substâncias que fornecem os nutrientes necessários ao crescimento, suporte e sobrevivência de microrganismos, sendo fundamentais na maioria dos testes microbiológicos. Mesmo com o aumento da utilização de métodos mais rápidos, a maioria das técnicas aplicadas no laboratório de controlo de qualidade na indústria farmacêutica, requerem meios de cultura (Sandle, 2012).

São tipicamente divididos com base no seu estado físico: meios líquidos (*broth*); e meios sólidos e semi-sólidos (*agar*). Podem também ser classificados quanto à sua funcionalidade: meios não selectivos, que contêm os nutrientes que a maioria dos microrganismos necessita, permitindo o crescimento de vários tipos de microrganismo; meios selectivos, que promovem o crescimento do microrganismos específicos, inibindo o crescimento de outros; meios diferenciais, que permitem a diferenciação de microrganismos pelas características que apresentam na presença de certos indicadores ou nutrientes; e meios de enriquecimento, que promovem o rápido crescimento de um tipo de microrganismo. Dependendo da aplicação necessária, vários meios de cultura são utilizados pela a indústria farmacêutica, estando na USP, 2012 em <1117> *Microbiological Best Laboratory Practices*, as recomendações gerais quanto à sua preparação, conservação e controlo de qualidade.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), a performance dos meios de cultura utilizados deve ser avaliada: ao nível da recuperação e sobrevivência de microrganismos alvo, inibição ou supressão de microrganismos não alvo, propriedades bioquímicas (indicativas, diferenciação), e outras, como pH, volume e esterilidade. Os Testes de Promoção de Crescimento, permitem avaliar as primeiras três propriedades, tornando-os numa etapa fundamental no controlo de qualidade dos meios de cultura. Ao estabelecer as propriedades nutritivas dos meios que serão usados nos procedimentos da farmacopeia, assegura-se que estes conseguem suportar o crescimento de concentrações baixas de microrganismos, no caso de meios não selectivos, e promover ou inibir o crescimento de microrganismos específicos, em meios selectivos. Assim, o principal objectivo dos Teste de Promoção de Crescimento é determinar se um novo lote de meio de cultura é adequado para utilização nos testes de controlo de qualidade microbiológica. (Fjeld, 2012)

### **3.1.1 – O Método**

Os procedimentos necessários à execução dos Testes de Promoção de Crescimento vêm descritos em três capítulos EP (2011), e estão harmonizados desde 2009 com a USP e Japanese Pharmacopoeia.

No capítulo 2.6.1, os testes são dirigidos aos meios, Fluid Thioglycollate media (FTM) e Tryptic Soy Broth (TSB), utilizados para avaliação da esterilidade de substâncias, preparações e artigos estéreis. No Capítulo 2.6.12, os testes têm que ser efectuados nos meios Tryptic Soy Agar (TSA) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA), utilizados nos testes de enumeração microbiológica de produtos não estéreis. E no Capítulo 2.6.13, os testes são dirigidos para os meios selectivos utilizados na pesquisa de microrganismos específicos, segundo a via de administração do produto, como listado em 5.1.4. Neste último, os meios testados variam consoante o tipo de produto que é fabricado em cada Farmacêutica, estando aqui citados alguns dos meios utilizados: MOSSEL enrichment broth (MOS), Violet Red Bile Glucose (VRBG), MacConkey broth (MCB), MacConkey agar (MCA), Cetrimide Agar (CEA) e Mannitol Salt Agar (MSA).

São também recomendados Testes de Promoção de Crescimento nos meios: *Reasoner's 2A agar* (R2A), utilizado na análise microbiológica de água purificada e em TSA (de sedimentação e de contacto), utilizados na monitorização ambiental de produção e de ensaios, efectuados nas APA, como citado na EP (2011), em *Water Purified Monograph*, e na USP (2012), em <1116>, respectivamente.

Os Testes de Promoção de Crescimento têm como base a inoculação, nos meios a testar, de microrganismos recomendados pela farmacopeia, atendendo à listagem de microrganismos necessários, que varia de meio para meio. Para que sejam aprovados, o crescimento obtido no lote teste, tem que ser comparável com o obtido em lotes anteriores. Cada ensaio, num determinado meio, corresponde a um microrganismo, e só após aprovação de todos os ensaios necessários, é que o meio pode ser considerado *Conforme*.

Segundo EP (2011) e USP (2012), todos os lotes de meios de cultura, quer sejam comprados prontos a utilizar ou preparados em laboratório, a partir de meio desidratado ou componentes, devem ser testados. Esta exigência é por muitos contestada. Um estudo feito em 1973, por Nagel e Kunz, coloca em causa a necessidade de Testes de Promoção de Crescimento em meios preparados prontos a usar. Eles examinaram 900 lotes de 46 meios

diferentes, representando 350.000 unidades de meios de cultura adquiridos, e encontraram apenas 17 lotes não satisfatórios. Já Cundell, em 2003, explora esse facto, no que diz respeito, aos meios de cultura preparados em laboratório, referindo que pouca informação adicional é dada pelos testes, que consomem recursos e tempo, considerando que todas as condições de preparação são controladas e que os parâmetros físicos são verificados.

A USP (2011) estabelece em <1117> que “*Quando os meios preparados no laboratório são correctamente preparados e esterilizados, utilizando um método validado, o Teste de Promoção de Crescimento pode ser limitado apenas aos lotes de meio desidratados,*” o que vai de encontro ao referido por Cundell (2003), no entanto, esta afirmação é seguida por “*salvo indicação em contrário no método relevante.*”. Olhando para os métodos que requerem estes testes (EP, 2011 e USP, 2011), e onde o procedimento vem explicado, este é antecipado pela frase “*Testar cada lote de meio pronto a utilizar ou cada lote de meio preparado a partir de meio desidratado ou ingredientes.*”, o que invalida a possibilidade de limitar os testes apenas a novos lotes de meio desidratado.

### **3.1.1.1 – Promoção de Crescimento**

Para todos os meios acima mencionados, são efectuados Testes de Promoção de Crescimento, pela inoculação de uma baixa quantidade de microrganismo ( $\leq 100$  UFC).

Nos meios sólidos, é efectuado espalhamento para distribuição do microrganismo pela placa, de modo a obter unidades formadoras de colónias (UFC), que são, no final do período de incubação, contabilizadas, e os resultados comparados com o obtido nas placas de controlo. Em meios não selectivo, só podem ser considerados *Conformes* os meios de cultura que não excedam num factor de 2, o obtido nas placas de controlo, enquanto que nos meios selectivos essa condição não é necessária. Já nos meios líquidos, o crescimento é dado pelo aparecimento de evidências de contaminação (turvação, sedimentação, etc.), que devem estar de acordo com o obtido em lotes anteriores.

A temperatura a que os meios são inoculados, corresponde ao mencionado nos capítulos respectivos (EP, 2011 em 2.1.6, 2.6.12 e *Water Purified Monograph*), já o tempo de incubação máximo permitido, é de 3 dias para bactérias e 5 dias para fungos, à excepção dos meios utilizados para pesquisa de microrganismos específicos, EP(2011), 2.6.13, em que o tempo de incubação corresponde ao período mínimo indicado no capítulo.

### 3.1.1.2 – Propriedades Indicativas e Inibitórias

Alguns meios selectivos, utilizados para pesquisa de microrganismos específicos, EP (2011), 2.6.13, são também testados quanto às suas propriedades indicativas e inibitórias. Para testar as propriedades indicativas, é feita a inoculação de não mais do que 100 UFC do microrganismo alvo, e as características deste, para meio testado, têm que ser compatíveis com o obtido em lotes anteriores, dentro do tempo de incubação indicado no capítulo. Já as propriedades inibitórias, são testadas com a inoculação de mais de 100 UFC nos meios alvo, sem que se observe crescimento do microrganismo até ao tempo máximo de incubação.

### 3.1.2– Estirpes utilizadas

São necessárias culturas de referência de microrganismos para o Teste de Promoção de Crescimento, e segundo a USP (2012) em <1117>, obtidas a partir de colecções nacionais de culturas ou de um fornecedor autorizado. (Tabela VI)

**Tabela VI:** Estirpes que podem ser utilizadas nos Testes de Promoção de Crescimento, segundo EP (2011) e USP (2012).

Microrganismo	Culturas de Referência <sup>a)</sup>
<i>Staphylococcus. aureus</i>	ATCC 6538, CIP 4.83, NCIMB 9518, NBRC 13276, NCTC 10788
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, CIP 82.118, NCIMB 8626, NBRC 13275
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 11437 ( CIP 100651, NCIMB 12343, NBRC 14293); ou ATCC 19404 (NCTC 532, CIP 79.03); ou NBRC 14293
<i>Cândida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, NBRC 1594
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739, CIP 53.126, NCIMB 8545, NBRC 3972
<i>Salmonela enterica subsp. enterica</i>	Serótipo Typhimurium: ATCC 14028; ou Serótipo Abony: NBRC 100797, NCTC 6017, CIP 80.39

a) ATCC (American Type Culture Collection); CIP (Collection of Institut Pasteur); NCIMB (National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria); NBRC (Biological Resource Center, NITE); NCTC (National Collection of Type Cultures); NCPF (National Collection of Pathogenic Fungi); IP (Fungi Culture Collection); IMI (International Mycological Institute).

O inóculo de microrganismos, a utilizar nos Testes de Promoção de Crescimento, pode ser estabelecido através de métodos espectrofotométricos, turbidimétricos, ou mais recentemente, pela utilização de estirpes certificadas, prontas a utilizar.

As estirpes certificadas prontas a utilizar, são fornecidas na forma de pastilhas liofilizadas quantificadas, permitindo a sua utilização em alguns passos rápidos e simples, eliminando as passagens necessárias para a manutenção das culturas (que segundo a EP, 2011, não podem ser superiores a cinco, vindas da cultura de referência) e a necessidade de medição e interpretação da densidade celular, diminuindo o tempo de preparação. Uma vantagem adicional, prende-se com a redução do risco de contaminação da amostra e do ambiente. (Fjeld, 2011) Cada lote de pastilhas liofilizadas de estirpes prontas a utilizar, deve estar acompanhado por um certificado de análise, que deve conter o nome e cultura de referência do microrganismo, prazo de validade e o valor de UFC por pastilha, bem como o método e meios utilizados para essa determinação.

Em adição aos microrganismos requeridos pelas farmacopeias, pode também ser útil a utilização de microrganismos de interesse, como por exemplo, contaminantes encontrados em Testes de Esterilidade ou microrganismos encontrados frequentemente nas monitorizações ambientais. No entanto, de acordo com Cundell (2003), deve-se resistir a esta ideia, uma vez que demonstrar que estes microrganismos podem crescer em meios de cultura dos quais foram isolados não deve ser uma surpresa, referindo que, o perigo de usar estes microrganismo é o facto dos resultados tenderem a ser uma medida de avaliação da capacidade do operador em manter e standardizar estes microrganismos e não numa medida de produtividade e selectividade do meio de cultura.

### **3.1.3 – Controlos**

Como já referido, nos meios não selectivos, deve-se utilizar como controlo, um lote anterior do mesmo meio de cultura, ou um meio de cultura não selectivo que permita a determinação do número de UFC presentes no inóculo (obrigatório quando se trata de meios líquidos), como forma de comparação com os resultados obtidos no meio de cultura teste. No entanto podem também ser utilizados, dados históricos de lotes anteriores do mesmo meio de cultura, caso se utilize um inóculo standardizado.

Já nos meios de cultura selectivos, não só é necessária a utilização lotes do mesmo meio como controlo, já aprovados, em paralelo ou através de dados históricos, para comparação do crescimento, como também é necessário um controlo utilizando meio de cultura não selectivo. No entanto, este último, não serve para comparação da recuperação, mas apenas para providenciar o número de UFC presentes no inóculo, uma vez que os microrganismos não recuperam tão bem um meio selectivo.

### **3.1.4 – A utilização dos Testes de Promoção de Crescimento em Validações**

Na USP (2012) em <1225>, a validação de um procedimento analítico, é o processo através do qual é estabelecido, por estudos laboratoriais, que as características de performance do procedimento vão de encontro aos pressupostos da sua aplicação analítica.

Na análise microbiológica na indústria farmacêutica, quando um procedimento analítico envolve crescimento microbiano em meio de cultura, para que um produto possa ser analisado, o método utilizado tem que ser validado para esse produto, ou seja, têm que ser feitos estudos, de modo a recolher dados que provem que o método detecta contaminação microbiana – Testes de Promoção de Crescimento.

A metodologia de validação do Teste de Esterilidade, vem em *Method Suitability Test*, na EP (2011) 2.6.1 e USP (2012) <71>, e dá-se pela inoculação de não mais do que 100 UFC das estirpes microrganismos, indicadas para o teste de promoção de crescimento, nos meios de cultura (método directo) ou na última lavagem com fluido (método de filtração por membrana), na execução do ensaio com o produto desejado.

Para a validação da metodologia utilizada para análise microbiológica da produtos não estéreis, em *Suitability of the counting method in the presence of the product* (EP, 2011; 2.6.12) e em *Suitability of the test Method* (EP, 2011; 2.6.13) a amostra preparada, com o produto a testar, é inoculada com não mais que 100 UFC das estirpes de microrganismos indicadas. O primeiro procedimento serve para validação do método de preparação da amostra e do método escolhido (entre os quatro métodos indicados) para a enumeração microbiana: TAMC (Contagem microrganismos aeróbios totais) e TYMC (Contagem de leveduras e bolores totais). Já o segundo procedimento referido serve para validação da metodologia para pesquisa de microrganismos específicos, utilizando o mesmo método de preparação da amostra.

Outras metodologias, como por exemplo, a análise microbiológica de água purificada, devem ser validadas sempre que haja alteração do método ou materiais. Mesmo que não referenciados pela EP e USP, os procedimentos a utilizar para a validação devem ser da responsabilidade do laboratório e ter em atenção os meios de cultura utilizados na análise, bem como os respectivos microrganismos utilizados nos Testes de Promoção de Crescimento dos meios.

Os testes de validação devem ser executados em separado, um para cada microrganismo, e em simultâneo com os testes de promoção de crescimento do respectivo microrganismo, como controlo positivo. Estes são declarados válidos, se ocorrer crescimento visível do microrganismo testado e esse crescimento for comparável com o obtido no teste de promoção de crescimento. Caso, estes pressupostos não se verifiquem, significa que o produto possui actividade antimicrobiana, e essa actividade não foi correctamente eliminada. Para isso, a USP, apresenta em <1227>, procedimentos a serem executados para determinação dessa actividade, e agentes neutralizantes a incorporar no meio de cultura, durante o teste.

A validação deve ser realizada em todos os novos produtos, e repetida sempre que ocorra alteração das condições experimentais. É com base nas validações, que são elaborados os procedimentos específicos para cada produto. Mesmo não sendo um requisito na farmacopeia, é considerado boa prática laboratorial a revalidação, nas condições experimentais utilizadas, de 12 em 12 meses. (PIC/S, PI 012-3, 2007)

### **3.1.5 – A aplicação do Teste de Promoção de Crescimento nos Laboratórios Atral**

Os Testes de Promoção de Crescimento nos Laboratórios Atral são executados a cada novo lote de meio de cultura, quer preparado em laboratório ou comprado pronto a usar.

Sempre que necessário, são também executadas validações utilizando Testes de Promoção de Crescimento. Estas são feitas sempre que se pretende validar um novo método, alterar o método utilizado num dado produto ou alterar equipamentos ou consumíveis considerados críticos.

### **3.1.6 – Trabalho desenvolvido durante o estágio**

Durante o estágio foram realizados todos os Testes de Promoção de Crescimento requeridos para os meios de cultura preparados ou prontos a usar, necessários nesse período, com o objectivo de controlar a qualidade destes antes da sua utilização, sendo por isso responsável pela sua preparação, execução, análise e registo, com a consequente aprovação ou não do lote testado.

Outro trabalho desenvolvido igualmente importante compreendeu dois processos de validação, através de Testes de Promoção de Crescimento, pela contaminação do produto com inóculo conhecido de microrganismos, aplicação do método de análise necessário.

O primeiro recorreu ao STERITEST para validação dos Meios de Cultura e Fluido D para ensaio de Esterilidade, com marca diferente à anteriormente utilizada. Este teve como objectivo demonstrar que o método STERITEST para a realização do ensaio de esterilidade, utilizando meios de cultura e fluido de marcas diferentes, é aplicável num produto já validado, permitindo detectar uma eventual contaminação do produto, caso ele a possua, e atendendo a que, a validação do método, valida também o conjunto amostra/acessórios e reagentes (meios e diluente) que utiliza.

O segundo processo consistiu na validação de um método de Enumeração Microbiológica para a análise de um produto específico – Filtração por Membrana, diferente do anteriormente utilizado. Teve, por isso como objectivo demonstrar que a aplicação do método de filtração por membrana é eficaz na detecção e enumeração de contaminação no produto.



### **3.2 – Metodologia**

Os Testes de Promoção de Crescimento, são efectuados à chama e em espaço próprio. É por isso necessária uma correcta higienização do ambiente do ensaio e materiais, e atenção por parte do operador durante os vários passos do ensaio, de modo, a evitar contaminação das amostras por parte do ambiente e operador, ou vice-versa.

Os registos dos Testes de Promoção de Crescimento de meios de cultura, são efectuados em duas etapas. Aquando da realização de um ensaio, onde se regista em folha própria, a data do ensaio, o microrganismo utilizado e o procedimento de recuperação desse, os meios e lotes testados, bem como os resultados observados, nestes e no controlo de suspensão, assinados pelo operador. A outra etapa de registo é uma listagem, feita em “logbook”, onde se dá entrada de todos os lotes de novos meios finda a sua análise, onde se insere o meio de cultura e lote, os microrganismos testados, bem como a data dos ensaios, e a data de aprovação do lote. Este último registo, permite controlar e verificar os lotes já aprovados, dando também indicação dos ensaios realizados e data em que foram executados, para mais facilmente se aceder a estes. Há que salientar que, enquanto nos meios comprados prontos a utilizar, o lote testado corresponde ao lote de fabrico, nos meios preparados em laboratório, o lote é dado pelo laboratório em função da sua esterilização, e não em função do lote de meio desidratado pelo qual é preparado.

Já os registos de Validações, utilizando os Testes de Promoção de Crescimento, são efectuados em folha própria, uma para cada ensaio, com a indicação do produto, método, meios e microrganismos utilizados, bem como os resultados obtidos e alterações efectuadas em cada ensaio. Findo o processo de validação, é elaborado o respectivo relatório, com a metodologia aprovada e resultados obtidos nos ensaios.

#### **3.2.1 – Teste de Promoção de Crescimento – Meios de Cultura**

Para testar os novos lotes de meios de cultura, a serem utilizados nos ensaios microbiológicos que seguem a farmacopeia foi necessário efectuar Testes de Promoção de Crescimento. Estes, baseiam-se nos procedimentos da EP (2011) em 2.1.6, para os meios a utilizar nos Testes de Esterilidade, em 2.1.12, nos meios a utilizar nos testes de enumeração de microrganismos e em 2.1.13, nos meios a utilizar nos testes de pesquisa de microrganismos específicos.

### Testes de Promoção do Crescimento

Os testes foram realizados consoante as necessidades, correspondendo cada teste a um microrganismo, e onde foram testados vários lotes de um ou mais meios de cultura, para qual o microrganismo é necessário para a validação. A validação de um lote só é considerada completa, quando os testes dão *Conformes* para todos os microrganismos exigidos pela EP (2011).

#### 3.2.1.1 – Preparação da Suspensão de Microrganismos

**Tabela VII:** Microrganismos e respectivos lotes utilizados nos Testes de Promoção de Crescimento, efectuados ao longo do estágio.

Microrganismo	ATCC/CIP	Lote	Nº médio de UFC		
			por pastilha	Fornecedor	
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	2372	1106	Laboratoire BioRéférence, IPL	
		2524	11062		
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 9027	2406	203		
		2436	2561		
		2500	7851		
<i>A. brasiliensis</i>	ATCC 16404	2492	1320		
		2541	13832		
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	482-120-1	50/0,1mL		MicroBioLogics®
		2305	1116		Laboratoire
<i>C. albicans</i>	ATCC10231	2456	23778		BioRéférence,
<i>C. sporogenes</i>	CIP 7939	2229	11532	IPL	
<i>E. coli</i>	ATCC 8739	2139	10892		

Para o lote de microrganismo necessário para o teste (**Tabela VII**) foi dissolvida uma pastilha num volume fixo de meio TSB (previamente validado) atendendo ao número de UFC por pastilha no certificado, ou caso existam, à percentagem de recuperação da pastilha em lotes anteriores, de modo a que, os volumes de inóculos finais de microrganismos estejam compreendidos entre 50µL e 500µL para os inóculos alvo (UFC) a utilizar nos diferentes meios (**Tabela VIII, IX, X**). Depois de levada ao vortex durante 1 minuto, a suspensão ficou pronta para ser utilizada.

**Tabela VIII:** Microrganismos, inóculo e condições de incubação para o teste de promoção de crescimento de meios não selectivos utilizados: nos Testes de Enumeração para produtos não estéreis, no controlo ambiental; na avaliação microbiológica da água purificada.

Meio de Cultura	Microrganismo	Inóculo (UFC) <sup>a)</sup>	Incubação	Controlo Suspensão
TSA (Sedimentação /Contacto) <sup>b)</sup>	<i>S. aureus</i>	50/25	30-35°C; 3 dias	TSA
	<i>P. aeruginosa</i>	50/25		
	<i>B. subtilis</i>	50/25		
	<i>C. albicans</i>	50/25	20-25°C; 5 dias	
	<i>A. brasiliensis</i>	100/50		
SDA <sup>b)</sup>	<i>A. brasiliensis</i>	100	20-25°C; 5 dias	
	<i>C. albicans</i>	50		
TSB <sup>b)</sup>	<i>S. aureus</i>	50	30-35°C; 3 dias	
	<i>P. aeruginosa</i>	50		
	<i>B. subtilis</i>	50		
	<i>C. albicans</i>	50	20-25°C; 5 dias	
	<i>A. brasiliensis</i>	100		
R2A <sup>c)</sup>	<i>P. aeruginosa</i>	50	30-35°C; 3 dias	
	<i>B. subtilis</i>	50		

a) Inóculo alvo, Segundo EP (2011) – Inóculo ≤100 UFC (placas de sedimentação/placas de contacto);

b) Segundo EP (2011) 2.1.12;

c) Segundo EP (2011) Monographs – Water, Purified

### 3.2.1.2 – Inoculação nas placas de controlo e meios de cultura a testar

**Tabela IX:** Microrganismos, inóculo e condições de incubação para o Teste de Promoção de Crescimento dos meios não selectivo utilizados nos Testes de Esterilidade.

Meio de Cultura	Microrganismo	Inóculo (UFC) <sup>d)</sup>	Incubação <sup>e)</sup>	Controlo Suspensão
FTM	<i>S. aureus</i>	50	30-35°C; 3 dias	TSA
	<i>P. aeruginosa</i>	50		
	<i>C. sporogenes</i>	50		
TSB	<i>A. brasiliensis</i>	100	20-25°C; 5 dias	
	<i>C. albicans</i>	50		
	<i>B. subtilis</i>	50	20-25°C; 3 dias	

d) Inóculo alvo Segundo EP (2011) – Inóculo ≤100 UFC

e) Segundo EP (2011) 2.1.6.

### Testes de Promoção do Crescimento

**Meios Sólidos:** Adicionou-se a duas placas de meio a testar e/ou de controlo, os volumes indicados para o inóculo pretendido. Depois de efectuado o espalhamento, com espalhador em forma de L, as placas foram incubadas invertidas como indicado na **Tabela VIII e X**.

**Meios Líquidos:** Adicionou-se aos meios a testar, os volumes indicados para o inóculos pretendidos. Depois de selados, agitaram-se suavemente e foram incubados à temperatura e tempo indicado (**Tabela VIII, IX e X**).

**Tabela X:** Microrganismos, inóculo e condições de incubação para o Teste de Promoção de Crescimento dos meios selectivos: utilizados nos Testes de Pesquisa de Microrganismos Específicos para produtos não estéreis.

Meio de Cultura	Microrganismo	Tipo de Teste <sup>f)</sup>	Inóculo (UFC) <sup>g)</sup>	Incubação <sup>h)</sup>	Controlo Suspensão				
MOS	<i>P. aeruginosa</i>	P	50	30-35°C; 24h	TSA				
	<i>E. coli</i>	P	50						
	<i>S. aureus</i>	I	150	20-25°C; 48h					
VRBG	<i>P. aeruginosa</i>	P + IND	50	30-35°C; 24h		TSA			
	<i>E. coli</i>	P + IND	50						
MCB	<i>E. coli</i>	P	50	42-44°C; 24h			TSA		
	<i>S. aureus</i>	I	150	42-44°C; 48h					
MCA	<i>E. coli</i>	P + IND	50	42-44°C; 72h				TSA	
CEA	<i>P. aeruginosa</i>	P	50	30-35°C; 18h					TSA
	<i>E. coli</i>	I	150	30-35°C; 72h					
MSA	<i>S. aureus</i>	P + IND	50	30-35°C; 72h	TSA				
	<i>E. coli</i>	I	150	30-35°C; 72h					

f) P -Promoção do crescimento; IND – propriedades Indicativas; I – Propriedades Inibitórias

g) Inóculo alvo segundo EP (2011): Inóculo *P* e *IND*: ≤100 UFC; *I*: >100 UFC.

h) Segundo EP (2011) 2.1.13.

### 3.2.2 – Validação de Meios e Fluido para ensaio de esterilidade – STERITEST

O Produto A e o Produto B, são produtos em que o método STERITEST foi já previamente validado, sendo por isso indicados para a validação de novos meios e fluidos, neste caso, de fornecedor diferente do anteriormente utilizado. Para a validação dos meios TSB e FTM, e de Fluido D foram efectuados seis ensaios de esterilidade pelo método STERITEST, por produto. Em cada ensaio, o produto é testado com 1 dos 6

microrganismos apontados pela EP (2011) utilizado o Fluido D e um dos meios de cultura a validar, sendo incubados á temperatura e tempo recomendados para o Teste de Promoção de Crescimento. (Tabela IX)

Para o inóculo alvo pretendido (Tabela XI) foi preparada a suspensão de microrganismos, atendendo às recomendações indicadas no certificado do lote de pastilhas seguindo o protocolo descrito no 3.2.1.1 – *Preparação da Suspensão de Microrganismos*, e considerando o número de UFC médio que vem neste (Tabela VII), de modo a que no final se obtenha um inóculo menor ou igual a 100 UFC, como vem indicado na EP (2011). Isso é confirmado pelo controlo de suspensão, pela inoculação em duas placas de meio sólido para obter o número de UFC médio por inóculo. Para que seja possível avaliar o crescimento obtido nos canisters, foi realizado um controlo positivo no mesmo lote de meios utilizados no ensaio.

**Tabela XI:** Lote de microrganismos, inóculo e controlos utilizados para validação do Fluido D e meios TSB e FTM.

Microrganismo	Lote	Inóculo		Meio Controlo Suspensão	Meio Controlo Positivo
		Volume ( $\mu$ L)	UFC alvo		
<i>S. aureus</i>	2372	180	100	TSA	
<i>P. aeruginosa</i>	2406	250	50		FTM
<i>C. sporogenes</i>	2229	150	100		
<i>C. albicans</i>	2456	125	100		
<i>A. brasiliensis</i>	2492	150	100		TSB
<i>B. subtilis</i>	486-120-1	100	50		

Estes testes, ao contrário do que acontece nas análises de rotina, não foram realizados nas APA, para evitar possíveis contaminações ambientais. O método não difere muito do utilizado em rotina (Capítulo II, 2.2.1.1), estando as alterações assinaladas em baixo.

Preparação do meios de cultura, fluído e amostras: Por ensaio analisou-se a quantidade de amostras necessárias para perfazer um total de 6 g filtradas para os canisters, e em função do microrganismo, foi utilizado o Fluido D e um dos meios de cultura a validar, em duplicado (um para cada canisters).

**Filtração das amostras e lavagens:** O inóculo de microrganismo foi adicionado ao frasco de Fluido D, a utilizar na última lavagem, e calculado de modo a que, uma vez que apenas vão 100 mL para cada canister, estes contenham a quantidade pretendida.

**Adição dos meios de cultura e incubação:** Foi introduzido o mesmo tipo de meio para os dois canisters, consoante o microrganismo utilizado, e incubado a temperatura e tempo indicadas para os testes de promoção de crescimento. (Tabela IX)

### **3.2.3 – Validação do Procedimento para avaliação microbiológica de produtos não estéreis: Caso de estudo - Testes de Enumeração por Filtração por Membrana**

O produto C, é um xarope, do grupo dos expectorantes, que por ser uma forma farmacêutica aquosa de administração oral, como indicado em EP (2011) em 5.1.4, requer a enumeração quantitativa dos microrganismos presentes na amostra através de testes de enumeração (TAMC e TYMC) (EP, 2011, 2.6.12), e a pesquisa de *E. coli* (EP, 2011, 2.6.13). O lote utilizado do Produto C, para validação do novo procedimento, encontrava-se conforme, estando apresentados os métodos e resultados obtidos na Tabela XII.

**Tabela XII:** Preparação da amostra, métodos utilizados e resultados obtidos na análise microbiológica do Produto C.

<b>Preparação da Amostra</b>	<b>Teste</b>	<b>Método</b>	<b>Resultados obtidos nas placas</b>
Diluição 1/10 em MLB, utilizando 10 mL de Produto C	Teste de Enumeração: TAMC	Incorporação: 1 mL Amostra → TSA (triplicado)	0 UFC ( < 10 UFC/mL)
	Teste de Enumeração: TYMC	Incorporação: 1 mL Amostra → SDA (triplicado)	0 UFC ( < 10 UFC/mL)
	Pesquisa de <i>E. coli</i>	Pré-incubação: 10 mL Amostra → TSB Seleção: MCB e Subcultura: MCA	Ausência de <i>E. coli</i>

A validação do procedimento de avaliação microbiológica do produto C, teve como objectivo a alteração do método utilizado para os testes de Enumeração, de incorporação para filtração por membrana, tendo sido executada em 3 fases: A 1ª fase, onde se procedeu

análise microbiológica do Produto C, como controlo do produto, alterando apenas o método de Enumeração, de incorporação para filtração por membrana, e volume de amostra utilizado; uma 2ª fase, com a realização de 5 ensaios de Testes de Enumeração, de acordo com o executado na 1ª fase, utilizando 1 dos 5 microrganismos apontados pela EP (2011) para validação dos Testes de Enumeração, utilizando duas preparações da amostra diferentes (1/10 e 1/100); e uma 3ª fase com a realização de um ensaio de Pesquisa de *E. coli*, utilizando a preparação da amostra escolhida na 2ª Fase e com *E. coli* como apontado pela EP (2011).

Para o inóculo alvo pretendido, utilizado na 2ª e 3ª fase (**Tabela XIII**), foi preparada a suspensão de microrganismos atendendo às recomendações indicadas no certificado do lote de pastilhas, seguindo o protocolo descrito no **3.2.1.1 – Preparação da Suspensão de Microrganismos** e considerando o número de UFC médio que vem neste (**Tabela VII**), de modo a que no final se obtenha um inóculo menor ou igual a 100 UFC, como vem indicado na EP (2011). Isso é confirmado com o controlo de suspensão, pela inoculação em duas placas de meio sólido para obter o número de UFC médio por inóculo.

**Tabela XIII:** Lote de microrganismos, inóculo e controlos, utilizados para validação dos Testes de Enumeração (TAMC e TYMC) e do Teste de Pesquisa de *E. coli*.

Microrganismo	Lote	Inóculo		Teste de Enumeração	Meios	Meio Controlo Suspensão
		Volume (µL)	UFC alvo			
<i>S. aureus</i>	2372	225	50			
<i>P. aeruginosa</i>	2436	100	12	TAMC	TSA	
<i>B. subtilis</i>	2305	225	25			
<i>C. albicans</i>	2456	105	50	TAMC	TSA	TSA
				TYMC	SDA	
<i>A. brasiliensis</i>	2492	150	100	TAMC	TSA	
				TYMC	SDA	
<i>E. coli</i>	2139	140	50	Pesquisa de <i>E. coli</i>	MCB	
					MCA	

### **3.2.3.1 – 1ª Fase - Análise microbiológica do Produto C: Testes de Enumeração e Pesquisa de *E. coli***

#### **i) Preparação da Amostra:**

A amostra foi preparada atendendo ao recomendado pela EP (2011) em 2.6.12, para produtos solúveis em água, com a diluição 1/10, de 10 mL de Produto C em MLB (*Letheen-Broth Base modified*).

#### **ii) Testes de Enumeração:**

(A filtração por membrana foi efectuada em duplicado, uma para TAMC e outra para TYMC.)

Montagem do sistema de filtração e humedecimento da membrana: O copo de filtração, de 47 mm de diâmetro, previamente esterilizado e que na sua base contém uma membrana com um diâmetro máximo de poro de 0,45µm, foi acoplado a um kitasato, por sua vez ligado a um sistema de vácuo. Adicionou-se aproximadamente 25 mL de TP 7.2 (Tampão Fostato, pH 7.2) para humedecimento da membrana.

Filtração da amostra e lavagens: Ao copo de filtração adicionou-se 10 mL de amostra preparada em i) (o equivalente a 1 mL de produto C), a bomba de vácuo foi accionada e a amostra filtrada. Foram de seguida efectuadas 3 lavagens com 100mL TP 7.2.

Meios de cultura e incubação: Por fim, a membrana foi removida do sistema, com a ajuda de uma pinça estéril e colocada no meio apropriado: em TSA para TAMC, sendo incubado a 30-35 °C e SDA para TYMC, incubado a 20-25°C, ambos durante 5 dias.

#### **iii) Pesquisa de *E. coli*:**

Pré-incubação, Selecção e Subcultura: A 90 mL de TSB adicionou-se 10 mL da amostra preparada em i). Após um período de incubação de 24h a 30-35°C, 1 mL foi transferido para 100 mL de MCB e incubado a 42-44°C por 48h. Por fim efectuou-se a subcultura para MCA a 30-35°C por 72h.



### 3.2.3.2 – 2ª Fase – Validação dos Testes de Enumeração do Produto C – Testes de Promoção de Crescimento

Em cada ensaio foi utilizado um dos microrganismos apontados pela EP (2011) para o teste de Enumeração a validar (TAMC e TYMC). (Tabela XIII) O método não difere muito do utilizado na 1ª Fase (3.2.3.1), estando as alterações assinaladas em baixo.

#### i) Preparação da Amostra:

Preparou-se duas amostras, uma amostra com uma diluição de 1/10 e outra com uma diluição de 1/100, ambas utilizando 10 mL de Produto C. A cada amostra foi adicionado o volume de inóculo, calculado para o microrganismo alvo. (Tabela XIII)

#### ii) Testes de Enumeração:

A filtração por membrana foi efectuada em duplicado, uma para cada diluição da amostra preparada. No caso de *A. brasiliensis* e *C. albicans*, em quadruplicado, duas para cada diluição da amostra, de forma a contemplar os dois testes necessários (TAMC e TYMC) com os respectivos meios (TSA e SDA).

Filtração da amostra e lavagens: O volume de amostra filtrada dependeu da diluição de amostra utilizada: para a diluição de 1/10, foram filtrados 10 mL e na diluição de 1/100, foram filtrados 100 mL, correspondendo em ambos a 1 mL de Produto C filtrado.

Meios de cultura e incubação: O/s meio/s utilizado/s variaram consoante o microrganismo utilizado (Tabela XIII), correspondendo os tempos e temperatura de incubação aos utilizados nos Testes Promoção de Crescimento dos meios, indicados na Tabela VIII.

### 3.2.3.3 – 3ª Fase – Validação do Teste de Pesquisa de *E. coli* no Produto C – Testes de Promoção de Crescimento

O ensaio efectuado para validação do Teste de Pesquisa de *E. coli* no Produto C, deu-se pela inoculação de *E. coli* (Tabela XIII) na amostra preparada em i), com uma diluição de 1/10, diluição validada na 2ª fase, seguido de pré-incubação, selecção e subcultura, como indicado na alínea iii) em 3.2.3.1.

### 3.2.4 – Teste de Avaliação da Recuperação dos lotes de pastilhas

Os testes de promoção de crescimento seguem regras bastantes estritas no que toca ao inóculo a utilizar: Este, deve ser igual ou inferior a 100 UFC (EP, 2011), de preferência entre 10 a 100 UFC; ou superior a 100 UFC, quando se pretende testar as propriedades inibitórias; e no caso de ser utilizado em validações de métodos, este não pode exceder em 1%, o volume de diluição da amostra a testar, normalmente de 100 mL (EP, 2011, 2.1.13). De forma a evitar alterações na preparação da suspensão, de teste para teste, procedeu-se à sua standardização em novos lotes. Os testes de avaliação da recuperação foram realizados antes da utilização desses lotes de microrganismo, em quaisquer testes.

#### 3.2.4.1 – Preparação da Suspensão de Microrganismos

O procedimento seguiu o descrito anteriormente (3.2.1.1), atendendo ao processo de recuperação da pastilha indicado na **Tabela XIX**.

**Tabela XIX:** Preparação da suspensão e inóculos para avaliação da recuperação do lote de pastilhas.

Microrganismo	Lote	Reconstituição da pastilha	Inóculo		Meio Controlo Suspensão
			Volume (µL)	UFC alvo	
<i>S. aureus</i>	2534	1 pastilha – 25mL TSB	50	22	TSA
			115	50	
			170	75	
<i>A. brasiliensis</i>	2541	1 pastilha – 30 mL TSB	110	50	
			165	75	
			215	100	
<i>P. aeruginosa</i>	2500	1 pastilha – 2 mL TSB	95	25	
			190	50	
			285	100	

#### 3.2.5.2 – Inoculação nas placas de controlo

Seguiu o procedimento para Meios Sólidos (3.2.1.2), onde para cada volume de inóculo se usou duas placas de controlo TSA.

### **3.3 – Análise e Discussão dos Resultados**

#### **3.3.1 – Teste de Promoção de Crescimento em meios de cultura**

Os meios de cultura que foram testados durante o estágio, podem ser divididos em não selectivos e selectivos. Os não selectivos englobaram, os meios utilizados para os Testes de Enumeração de produtos não estéreis (EP, 2011, 2.1.12), TSA, SDA e TSB, preparados no laboratório a partir de meio desidratado; os meios utilizados no Teste de Esterilidades de produtos estéreis (EP, 2011, 2.1.6), TSB e FTM, tanto os preparados em laboratório como os comprados prontos a utilizar; os meios TSA de sedimentação e TSA de contacto para monitorizações ambientais (da produção e dos ensaios), e o meio R2A, utilizado na análise de água purificada (EP,2011, *Monographs – Water Purified*) Já os selectivos, referem-se aos meios utilizados na Pesquisa de Microrganismos Específicos em produtos não estéreis (EP, 2011, 2.1.13), MOS, VRBG, MCB, MCA, CEA e MSA, preparados em laboratório ou prontos a serem utilizados.

Os meios de cultura não selectivos, num ensaio, só podem ser considerados *Conformes* perante um microrganismo, caso contemplem todos os critérios indicados na EP(2011)/USP(2012) (**Tabela XX**). Nos meios sólidos (TSA, SDA e R2A), o aparecimento de colónias individualizadas e iguais deve ser claramente observado, e após contagem, a média de UFC obtida no lote teste, não deve exceder num factor de 2, o obtido nas placas de controlo, significando, que para uma média de 50 UFC nas placas de controlo, a média de UFC nas placas teste tem que estar compreendida entre 25 e 100 UFC.

Já os meios líquidos, são observados à luz, na procura de uma ou mais evidências de crescimento microbiano, tais como: formação de aglomerados de colónias; de películas na superfície do meio; presença de sedimentação; de turvação no meio e de fibras soltas ou enoveladas como algodão. Esse crescimento, tem que ser equiparável ao previamente obtido para o microrganismo em questão, e na presença de vários lotes, equiparável entre eles. Um lote em que só se observe crescimento 24h depois dos restantes, mesmo que dentro do tempo estipulado, deve ser repetido. Pois esta diferença, pode dever-se a algum erro por parte do operador, por exemplo, na falha de homogeneização da suspensão entre ensaios, ou então, devido ao próprio meio, não sendo eficiente na promoção do crescimento de microrganismos.

**Tabela XX:** Critérios necessários para conformidade dos testes nos lotes de meios de cultura não selectivos: utilizados nos Testes de Enumeração para produtos não estéreis, no controlo ambiental; e nos testes de esterilidade.

Meio de Cultura	Critério a verificar para Conformidade do Teste	
<b>TSA</b> (Sedimentação /Contacto)	- A média de UFC obtida nos meios testes não deve exceder num factor de 2, o valor obtido no controlo.	- Controlo de suspensão comprova a existência de $\leq 100$ UFC/inóculo;
<b>SDA</b>		
<b>R2A</b>		- Crescimento nos meios evidente dentro do período de incubação.
<b>TSB</b>	- Crescimento equiparável ao obtido em lotes anteriores.	
<b>FTM</b>		

Os critérios para aceitação de um ensaio, em meios selectivos, segundo a EP(2011)/USP(2012), varia com o tipo de teste necessário (promoção, indicativo, inibição). (Tabela XXI)

**Tabela XXI:** Critérios necessários para conformidade dos lotes de meios de cultura selectivos utilizados nos Testes de Pesquisa de Microrganismos Específicos para produtos não estéreis.

Tipo de Teste	Critério a verificar para Conformidade do Teste	
<b>Promoção</b>	- Crescimento equiparável ao obtido em lotes anteriores.	- Controlo de suspensão comprova a existência de $\leq 100$ UFC/inóculo;
<b>Propriedades Indicativas</b>	- Colónias equiparáveis em aparência e nas reacções indicativas, relativamente ao observado em lotes anteriores.	- Crescimento nos meios evidente dentro do período de incubação.
<b>Propriedades Inibitórias</b>	- Sem observação de crescimento nos meios teste.	- Controlo de suspensão comprova a existência de $> 100$ UFC/inóculo.

Nos testes de Promoção de Crescimento a principal diferença, quando comparado com os meios não selectivos, prende-se com a não exigência de crescimento, nos meios sólidos, que não exceda num factor de 2, ao obtido nas placas de controlo, meio não selectivo. Aqui, apenas é exigido um crescimento equiparável ao previamente obtido nesse meio, pois, a recuperação de microrganismos em meios selectivos, é usualmente inferior. As

propriedades indicativas são visualizadas nas placas de Promoção de crescimento do meio, mas, enquanto estas devem ser observadas dentro do tempo de incubação máximo, a promoção de crescimento deve ser observada no tempo mínimo de incubação (**Tabela X**). As propriedades inibitórias, como o nome indica, pretendem comprovar a inibição de determinados grupos de microrganismos num meio, isto é conseguido pela inoculação de mais de 100 UFC, sem que se observe crescimento durante o tempo de incubação máximo, proposto pela EP (2011).

**Tabela XXII:** Número total de ensaios e quantidade de lotes utilizados de microrganismos.

Microorganismo	Nº total de ensaios	Quantidade de lotes utilizados
<i>S. aureus</i>	29	2
<i>P. aeruginosa</i>	29	3
<i>A. brasiliensis</i>	17	2
<i>B. subtilis</i>	23	2
<i>C. albicans</i>	16	1
<i>C. sporogenes</i>	21	1
<i>E. coli</i>	6	1
<b>Total</b>	141	13

Ao todo, foram realizados 141 ensaios de testes de promoção de crescimento, onde se testou 227 lotes de meios de cultura. Os meios mais testados, foram os utilizados nos Testes de Esterilidade (FTM e TSB) e os meios utilizados na monitorização tanto na produção, como das salas APA (TSA de sedimentação e contacto) (**Tabela XXII e XXIII**).

Como já referido anteriormente, nos meios não selectivos sólidos (TSA de sedimentação, TSA de contacto, SDA e R2A) a conformidade dos lotes está dependente da seguinte condição: a média de UFC obtida nos meios não deve exceder num factor de 2, o valor obtido no controlo (**Tabela XX**). Esta condição pode ser avaliada através do cálculo da taxa de recuperação, pela razão entre a média de UFC obtida nas placas teste, e a média de UFC obtida nas placas de controlo, expressa em percentagem. Caso, a taxa de recuperação esteja compreendida entre 50% e 200% em todos os ensaios, então o lote apresenta-se *Conforme*.

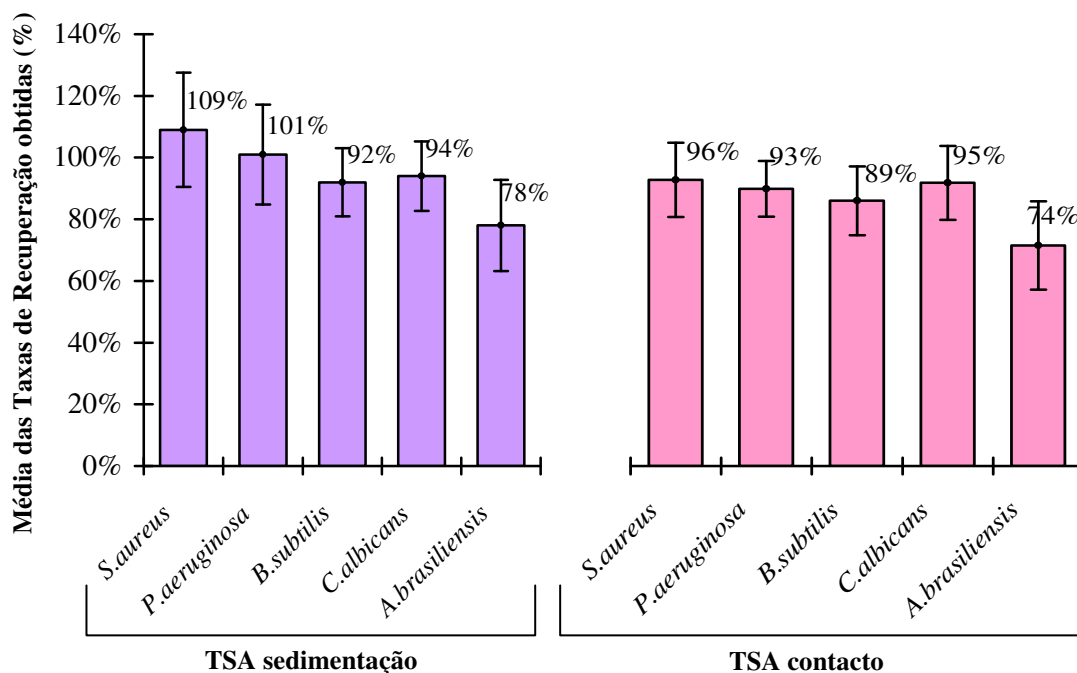
**Tabela XXIII:** Resultados obtidos nos Testes de Promoção de Crescimento. Microrganismos necessários para a validação do lote, total de lotes testados.

Microrganismo utilizado para Validação	Meios de Cultura											
	FTM	TSB	TSA Sed	TSA Cont	SDA	R2A	MOS	VRBG	MCB	MCA	CEA	MSA
<i>S. aureus</i>	X	X <sup>a)</sup>	X	X			X		X			X
<i>P. aeruginosa</i>	X	X <sup>a)</sup>	X	X		X	X	X			X	
<i>A. brasiliensis</i>		X	X	X	X							
<i>B. subtilis</i>		X	X	X		X						
<i>C. albicans</i>		X	X	X	X							
<i>C. sporogenes</i>	X											
<i>E. coli</i>							X	X	X	X	X	X
<b>Validados</b>	112	59	16	11	4	6	2	4	2	5	1	1
<b>Lotes Testados</b>	112	60	16	14	4	6	2	4	2	5	1	1

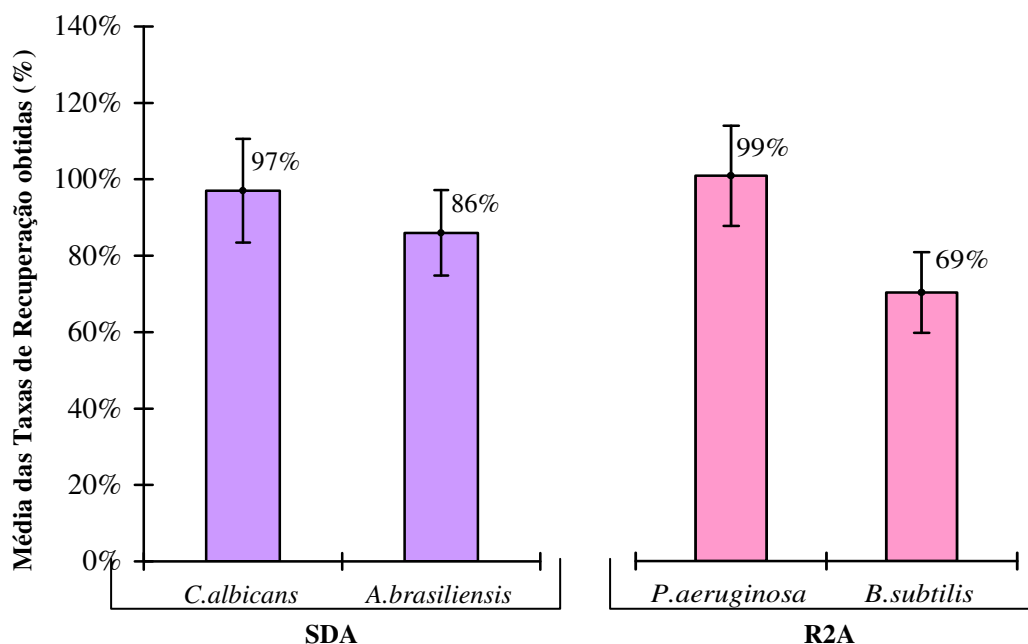
a) Utilizados nos testes de promoção de crescimento de TSB para Testes de Enumeração, (EP, 2011; 2.1.12).

Num lote, o facto de se obter diferenças acentuadas nas taxas de recuperações entre microrganismos, desde que compreendidas no intervalo indicado, não invalidam a conformidade do lote. No conjunto de lotes *Conformes* que foram analisados, procedeu-se à análise das taxas de recuperação obtidas, em função do meio de cultura testado e do microrganismo utilizado. Obteve-se para todos os meios, não só uma média de taxas de recuperação próxima dos 100%, como também diferenças de taxas de recuperação pouco acentuadas entre lotes, explicado pelo desvio padrão obtido para cada um dos microrganismos. (Gráfico IV e V)

Há que salientar, que ao analisar as taxas de recuperação dos diferentes microrganismos, no total de lotes de TSA de sedimentação e contacto, verificou-se que a recuperação de *A. Brasiliensis* foi ligeiramente mais baixa, quando comparado com os restantes microrganismos testados, e também quando comparado com o obtido nas placas de SDA, algo já esperado, tendo em conta que, este último é o meio de eleição para o crescimento deste microrganismo. (Gráfico IV e V) O mesmo observou-se nas placas de R2A, para o *B. subtilis*. Mas, as pastilhas liofilizadas utilizadas, são do microrganismo na forma de esporo, podendo alguns dos esporos presentes no inóculo não ter germinado. (Gráfico V)



**Gráfico IV:** Média e desvio padrão das taxas de Recuperação obtidas em função do microrganismo, no total de lotes de TSA de sedimentação e TSA de Contacto, testados e conformes.



**Gráfico V:** Média e desvio padrão das taxas de Recuperação obtidas em função do microrganismo, no total de lotes de SDA e R2A, testados e conformes.

Apenas quatro lotes de meios de cultura não foram validados, isto é, não passaram todos os requisitos necessários num ou mais ensaios (**Tabela XXIII**). Não foram aprovados três lotes, dos primeiros a serem testados, de placas TSA de contacto, compradas prontas a utilizar, por não promoverem o crescimento de *B. subtilis*, um dos cinco microrganismos

necessários para validação do lote, e um lote de TSB, utilizado nos Testes de Esterilidade e preparado no laboratório, por também não promover o crescimento do mesmo microrganismo. Estes ensaios foram realizados em separado e em tempos distintos, e a não conformidade dos lotes só foi estabelecida após várias repetições, a que estes foram sujeitos, e onde se observou: crescimento dentro do tempo estipulado nas placas de controlo; crescimento em lotes do mesmo meio, testados em simultâneo e com boa recuperação, em conformidade com o exigido pela EP (2011). Estas observações, permitiram descartar problemas por parte do operador, durante a execução dos ensaios e problemas com a pastilha de *B.subtilis* utilizada.

De acordo com Sutton (2006) não existem evidências científicas convincentes que argumentem a necessidade de efectuar Testes de Promoção de Crescimento em TSB, apesar de ser requerido pelas várias farmacopeias. No entanto, é perante resultados negativos, que se observa a importância da aplicação destes testes, antes da utilização dos meios de cultura, devendo permanecer uma exigência por parte das farmacopeias para todos os meios já ponderados, até porque, estes testes não podem ser considerados como um método de averiguação do tipo de meio, mas com um método de averiguação de todo o processo de preparação do meio de cultura, acrescentando a sua importância na detecção de baixas concentrações de microrganismos numa amostra, em especial, em Testes de Esterilidade, como é o caso do meio TSB.

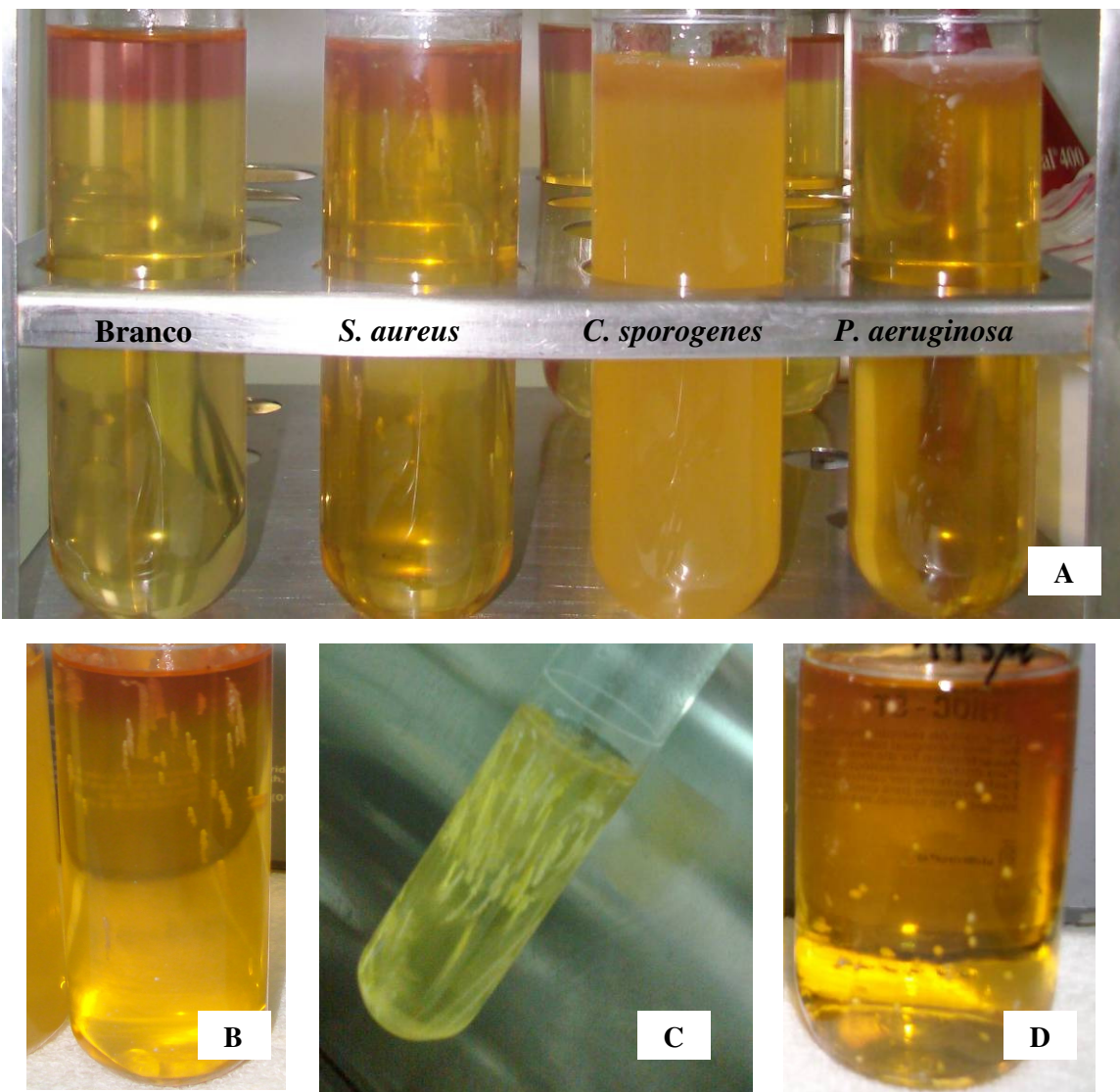
Quando em meios preparados em laboratórios, os Testes de Promoção de Crescimento podem alertar para algum problema na execução e/ou esterilização ou no lote de meios desidratado, utilizado na preparação do meio. Esta última possibilidade, foi descartada, no caso do lote de TSB *Não Conforme*, uma vez que, o meio desidratado utilizado, encontrava-se dentro do prazo, e outros lotes testados provenientes desse meio encontravam-se *Conformes* nos testes de promoção de crescimento. Quanto aos meios prontos a utilizar, os testes de promoção de crescimento podem alertar para lotes que não cumprem os requisitos segundo a EP (2011), no caso das placas de TSA de contacto, depois de três lotes de um mesmo fornecedor *Não Conformes* quanto à promoção de crescimento de *B. subtilis*, optou-se pela mudança de fornecedor.

Para além da observação de crescimento, durante a análise dos resultados, o operador deve estar atento às características do crescimento de cada microrganismo. Para cada meio um microrganismo apresenta determinadas características, e estas devem estar de acordo com



o observado entre diferentes lotes do mesmo meio e ao longo do tempo, nos vários ensaios efectuados.

Tomando o exemplo do FTM, um meio que permite o crescimento de microrganismos aeróbios e anaeróbios, as características de crescimento nos três microrganismos, usados para o teste de promoção de crescimento, são facilmente diferenciadas (**Figura VI-A**).



**Figura VI:** Teste de Promoção de Crescimento em FTM: (A) Características do crescimento em FTM (meios desidratado, preparado no laboratório) de *S. aureus*, *C. sporogenes* e *P. aeruginosa* ao fim de 48 horas a 30-35°C; (B) Características do crescimento de *S. aureus* ao fim de 48 horas, cinta vermelha ainda evidente; (C) ao fim de 72 horas, desaparecimento da cinta vermelha; (D) Características do crescimento de *S. aureus* em FTM (comprado pronto a usar) ao fim de 48 horas.

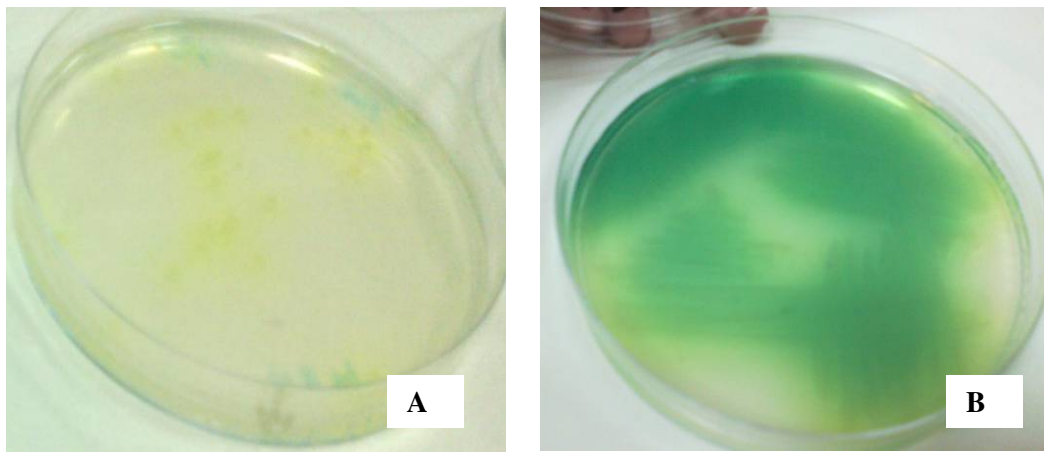
### *Testes de Promoção do Crescimento*

Ao fim de 48h, no tubo com *P. aeruginosa*, observa-se ligeira turvação, com sedimentação e formação de película no topo do tubo, pois, por ser um microrganismo aeróbio, o seu crescimento ocorre no topo. Já no tubo com *C. sporogenes*, observa-se turvação por todo o tubo, principalmente na base, uma vez que é anaeróbio, o seu crescimento ocorre no fundo do tubo onde não há oxigénio; No tubo com *S. aureus*, observa-se crescimento em pequenos aglomerados que se prolongam pelo tubo, isto ocorre por ser um microrganismo anaeróbio facultativo.

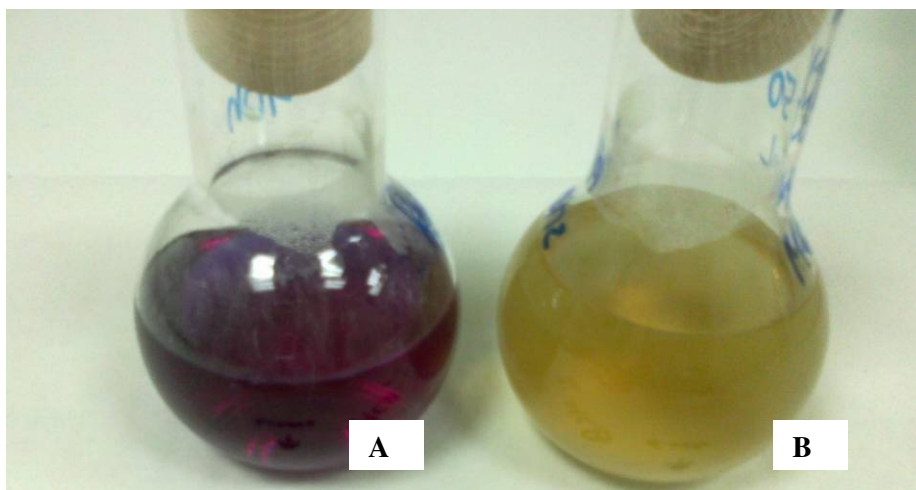
A cinta avermelhada no topo do tubo, característica deste meio, devido à presença de Sódio Resazurin, um indicador da presença de oxigénio, não deve ultrapassar 1/3 do volume total do meio, caso aconteça, o crescimento de microrganismos anaeróbios pode ficar comprometido. Na presença de contaminação, esta película vai ficando reduzida acabando por desaparecer, isto é logo visível quando se faz os testes de promoção de crescimento de *C. sporogenes* e *P. aeruginosa* ao fim de 48h, no caso de *S. aureus*, só é visível ao fim de 72h (**Figura IV – B e C**). O desaparecimento da cinta nos tubos com *C. sporogenes*, deve-se à turvação do meio, impossibilitando a sua visualização, mas, no caso de *P. aeruginosa* e *S.aureus*, deve-se ao consumo de oxigénio, que no último se dá mais tardiamente, por ser um microrganismo anaeróbio facultativo. Outro dado importante, observado no crescimento de *S. aureus* em FTM, está nas diferentes características que apresenta, no meio produzido em laboratório e no meio comprado pronto a utilizar para uso no método STERITEST. Neste último, o crescimento dá-se também por todo o conteúdo, mas os aglomerados formados são redondos, isto deve-se possivelmente à baixa profundidade e maior largura do frasco (**Figura VI – B e D**).

Em três dos meios selectivos testados, VRBG, MSA e MCA, foram analisadas as propriedades indicativas, e estas têm que também estar de acordo com a literatura e com o observado entre diferentes lotes do mesmo meio e ao longo do tempo. (**Anexo II**). Nos meios R2A, CEA (**Figura VII**) e MCB (**Figura VIII**), não é necessário a avaliação das propriedades indicativas. (EP, 2011 e USP, 2012) No entanto, com os ensaios efectuados, observou-se características indicativas em alguns dos microrganismos utilizados para os Testes de Promoção de Crescimento. No caso de R2A e CEA, o crescimento de *P. aeruginosa* é facilmente identificado pelo aparecimento de colónias verdes, com fluorescência quando observadas ao UV. Já no meio MCB, o crescimento de *E. coli* conduziu a uma mudança de cor do meio de roxo para amarelado. Estas propriedades indicativas devem ser registadas e conhecidas pelo operador e constantes de ensaio para

ensaio, no entanto, não são consideradas nem necessárias para efeitos de validação do meio, até porque, dando o exemplo do meios MCB, que é utilizado na Pesquisa de *E. coli*, a não alteração de cor do meio não implica a conformidade do produto quanto à ausência de *E. coli*. Essa ausência só pode ser averiguada depois da subcultura para meio MCA, sem que se observe crescimento.



**Figura VII:** Teste de Promoção de Crescimento de CEA: (A) Características das colónias de *P. aeruginosa* no Teste de Promoção de Crescimento; (B) Características do crescimento de *P. aeruginosa*, após repicagem.



**Figura VIII:** Teste de Promoção de Crescimento de MCB: (A) Branco MCB; (B) Características do crescimento de *E. coli* no Teste de Promoção de Crescimento, meios passa de roxo a amarelo devido à formação de gás e ácido, pela fermentação de lactose.

Olhando para a quantidade de Testes de Promoção de Crescimento efectuados ao longo do estágio, são claramente visíveis, o tempo e recursos consumidos na sua execução. Mesmo atendendo ao apontado por alguns autores, com Cundell (2003) e Nagel e Kunz (1973), quanto à execução dos testes em todos os meios preparados em laboratório ou comprados prontos a usar, estes são hoje em dia ainda um requisito por parte das farmacopeias.

Contudo, é possível mesmo assim minimizar estes consumos. Sugere-se para os meios prontos a usar, sempre que possível, a compra de uma maior quantidade de meio numa só requisição, de forma a diminuir a quantidade de lotes diferentes. Já para os meios produzidos em laboratório, sugere-se estudos, através de Testes de Promoção de Crescimento, da estabilidade dos meios de cultura, para verificar se é possível aumentar o tempo de validade. Caso seja possível, em alguns meios, este processo pode ser seguido pelo aumento da quantidade produzida por lote, diminuindo a longo prazo a quantidade de testes necessários. Quando o aumento do número de meios por lotes não é exequível, o aumento do tempo de validade pode ser útil, podendo-se, através de uma cuidada programação, conseguir uma diminuição da quantidade de testes, pelo aumento do número de lotes testados num só ensaio.

### **3.3.2 – Validação de Meios e Fluido para ensaio de esterilidade – STERITEST**

Para validação dos Meios (TSB e FTM) e Fluido D, foi necessário testá-los com o método em que vão ser empregues – STERITEST, através de Testes de Promoção de Crescimento, utilizando dois produtos já anteriormente validados. Assim, foram realizados 6 ensaios de STERITEST por produto, cada um, com um inóculo específico de microrganismos e utilizando o fluido D e meios apropriados a testar (**Tabela XI**).

Os ensaios, a que os meios e fluido são sujeitos, têm que passar alguns requisitos: Com um inóculo menor ou igual a 100 UFC, os meios utilizados com controlos positivos (directamente inoculados com o microrganismo) têm que apresentar crescimento dentro do tempo estipulado (**Tabela IX**); e os meios a testar, têm que apresentar crescimento e este tem que ser equiparável ao observado no controlo positivo. Caso um destes requisitos não se verifique, o ensaio é considerado *Não Conforme*, mostrando que meios e/ou o fluido não se encontram nas condições desejáveis, ocorrendo inibição do crescimento de microrganismos presentes na amostra (USP, 2012, <1227>).

**Tabela XXIV:** Resultados obtidos nos Testes de Promoção de Crescimento para validação dos meios de cultura e fluido D por STERITEST com o Produto A.

Microrganismo	Meios de Cultura	Controlo Inóculo (UFCmédio/volume de inóculo)	Crescimento no Controlo Positivo do Meio	Ensaio STERITEST Produto A	
				Canister 1	Canister 2
<i>S. aureus</i>	FTM	120	+ (após 48h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>P. aeruginosa</i>		95	+ (após 48h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>C. sporogenes</i>		34	+ (após 48h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>C. albicans</i>	TSB	92	+ (após 72h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>A. brasiliensis</i>		40	+ (após 72h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>B. subtilis</i>		34	+ (após 48h)	Satisfatório	Satisfatório

Nos ensaios efectuados (**Tabela XXIV e XXV**), observou-se crescimento nos canisters com um comportamento *Satisfatório*, pois, as evidências de crescimento microbiano, características dos microrganismos, foram iguais entre meios teste e controlo positivo, dentro do tempo de incubação. Estes resultados permitiram a validação do fluido e meios de cultura, por mostrarem que o fluido seleccionado é eficiente na dissolução e lavagens do produto durante a filtração, e que os meios utilizados permitem o crescimento de baixas concentrações de microrganismos presentes na amostra, sendo viáveis para utilização no método STERITEST.

**Tabela XXV:** Resultados obtidos nos testes de promoção de crescimento para validação dos meios de cultura e fluido D por STERITEST com o Produto B.

Microrganismo	Meios de Cultura	Controlo Suspensão (UFCmédio/volume de inóculo)	Crescimento no Controlo Positivo do Meio	Ensaio STERITEST Produto B	
				Canister 1	Canister 2
<i>S. aureus</i>	FTM	120	+ (após 48h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>P. aeruginosa</i>		66	+ (após 48h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>C. sporogenes</i>		34	+ (após 48h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>C. albicans</i>	TSB	92	+ (após 72h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>A. brasiliensis</i>		23	+ (após 72h)	Satisfatório	Satisfatório
<i>B. subtilis</i>		34	+ (após 48h)	Satisfatório	Satisfatório

### *Testes de Promoção do Crescimento*

Relativamente ao controlo do inóculo, à excepção do *S. aureus*, em que o número de UFC obtido distanciou-se do valor esperado, atendendo ao que constava no certificado das pastilhas, todos os valores encontrados nas placas de controlo de inóculo foram iguais ou inferiores a 100 UFC.

Sugere-se, em próximas validações, a utilização de um alvo de 50 UFC, em vez dos 100 UFC utilizados, exceptuando no caso da utilização de *A. Brasiliensis*, que, como se verificou nos Testes de Promoção de Crescimento de meios de cultura, tem uma recuperação mais baixa que os restantes. Sugere-se também, a avaliação do lote de pastilhas antes da sua utilização em Testes de Promoção de Crescimento e validações, pois irá permitir um melhor controlo sobre o inóculo a utilizar e evitar valores fora dos limites estipulados.

Segundo a USP (2012) em <1227>, a validação pode ser estabelecida pela comparação directa dos resultados obtidos nos ensaios com o microrganismo mais produto, com os obtidos no controlo positivo (inoculação directa dos meios), como efectuado neste caso. Mas, para controlo extra nas validações com o método STERITEST, poderia ser utilizado em simultâneo, um ensaio de STERITEST por microrganismo sem produto, o que iria permitir comparar melhor a influência dos meios/fluido/técnica/produto, na ocorrência de inibição do crescimento.

A validação, quer seja do método, quer seja dos materiais e reagentes utilizados, tem uma grande importância na garantia de qualidade do ensaio de esterilidade. Esta, possibilita mostrar a adequação dos mesmos, neste caso, da utilização de novos meios e fluido, demonstrando que o método aplicado é eficaz na inibição da actividade antimicrobiana do produto e descartando a possibilidade de aparecimento de falsos negativos.

Para os Laboratórios Atral a validação efectuada teve uma grande importância na redução de custos, uma vez que foi possível alterar de fornecedor, adquirindo meios e fluido mais baratos e que demonstraram ser igualmente eficazes.

### **3.3.3 – Validação do Procedimento para avaliação microbiológica de produtos não estéreis: Caso de estudo - Testes de Enumeração por Filtração por Membrana**

A validação do procedimento para análise microbiológica do Produto C, nomeadamente a alteração do método para enumeração microbiológica de incorporação para filtração por membrana, foi executada em 3 fases.

Na 1ª fase procedeu-se à análise de um lote já testado e conforme de Produto C (**Tabela XII**), sem a adição de microrganismos, alterando apenas o método utilizando para testes de Enumeração e consequentemente a quantidade de amostra testada, de 1 mL (que equivale a 0,1 mL de Produto C) para 10 mL (1 mL do Produto C). Os resultados foram expressos em UFC/mL de Produto, segundo indicações da EP (2011) e USP (2012). (**Tabela XXVI**)

Obteve-se, ausência de UFC nas placas (de TSA – TAMC e de SDA - TYMC), resultado concordante com o obtido pelo método de incorporação. Tendo em conta estes resultados, e com base também nos dados históricos deste produto, onde os resultados evidenciam a existência de baixas concentrações de microrganismos ou até mesmo ausência destes, o método de filtração por membrana é possivelmente o mais adequado para utilização, uma vez que tem uma maior sensibilidade, permitindo a análise de uma maior quantidade de amostra (10 mL), que por corresponderam a 1mL de Produto C, nos dá directamente o valor de UFC.

**Tabela XXVI:** Preparação da amostra, métodos utilizados e resultados obtidos na análise microbiológica do Produto C, utilizando o método de filtração por membrana para Enumeração Microbiológica – 1ªFase.

<b>Preparação da Amostra</b>	<b>Teste</b>	<b>Método</b>	<b>Resultados obtidos nas placas</b>
Diluição 1/10 em MLB, utilizando 10 mL de Produto C	Teste de Enumeração: TAMC	Filtração por Membrana: 10 mL Amostra → TSA	0 UFC ( < 1 UFC/mL)
	Teste de Enumeração: TYMC	Filtração por Membrana: 10 mL Amostra → SDA	0 UFC ( < 1 UFC/mL)
	Pesquisa de <i>E. coli</i>	Pré-incubação: 10 mL Amostra → TSB Seleção: MCB e Subcultura: MCA	Ausência de <i>E. coli</i>

Mesmo observando-se concordância de resultados encontrados na 1ª fase, com os obtidos na análise de rotina utilizada, um método já validado, para a validação do novo método é necessário provar através de Testes de Promoção de Crescimento, que este, consegue eliminar eficazmente actividade antimicrobiana presente na amostra ou possíveis interferências por parte dos materiais e reagentes utilizados. Para isso, foram realizados 5 ensaios utilizando o método de filtração para enumeração microbiológica do produto C (2ª fase), cada um com um dos microrganismos requeridos (**Tabela XIII**), onde, para um inóculo menor ou igual a 100 UFC, os meios (TSA e/ou SDA) têm que apresentar crescimento dentro do tempo estipulado e em conformidade com o obtido no controlo positivo, com uma taxa recuperação superior a 70%. Caso um destes requisitos não se verifique, o ensaio é considerado *Não Conforme*, mostrando que o método não está a ser empregado nas condições desejáveis, ocorrendo inibição do crescimento de microrganismos presentes na amostra (USP, 2012, <1227>). Foram utilizadas duas diluições do produto C, amostra 1/10 e amostra 1/100, de forma a avaliar as taxas de recuperação nos diferentes ensaios, atendendo a que, caso as taxas de recuperação nos ensaios com amostra 1/10 e 1/100, estejam de acordo com os requisitos (superior a 70%), é considerada para validação a menor diluição (1/10).

**Tabela XXVII:** Resultados obtidos nos Testes de Promoção de Crescimento para validação do método de filtração por membrana nos Testes de Enumeração do Produto C – 2ª Fase.

Microrganismo	Teste de Enumeração	Controlo Suspensão (UFCmédio/volume de inóculo) <sup>i)</sup>	UFC/mL de produto C Esperado <sup>j)</sup>	UFC/mL de Produto C (UFC/placa)	
				Amostra 1/10	Amostra 1/100
<i>S. aureus</i>		85	9	9	12
<i>P. aeruginosa</i>	TAMC	109	11	9	7
<i>B. subtilis</i>		50	5	4	2
<i>A. brasiliensis</i>	TAMC	75	8	10	5
	TYMC			7	7
<i>C. albicans</i>	TAMC	47	5	4	4
	TYMC			5	2

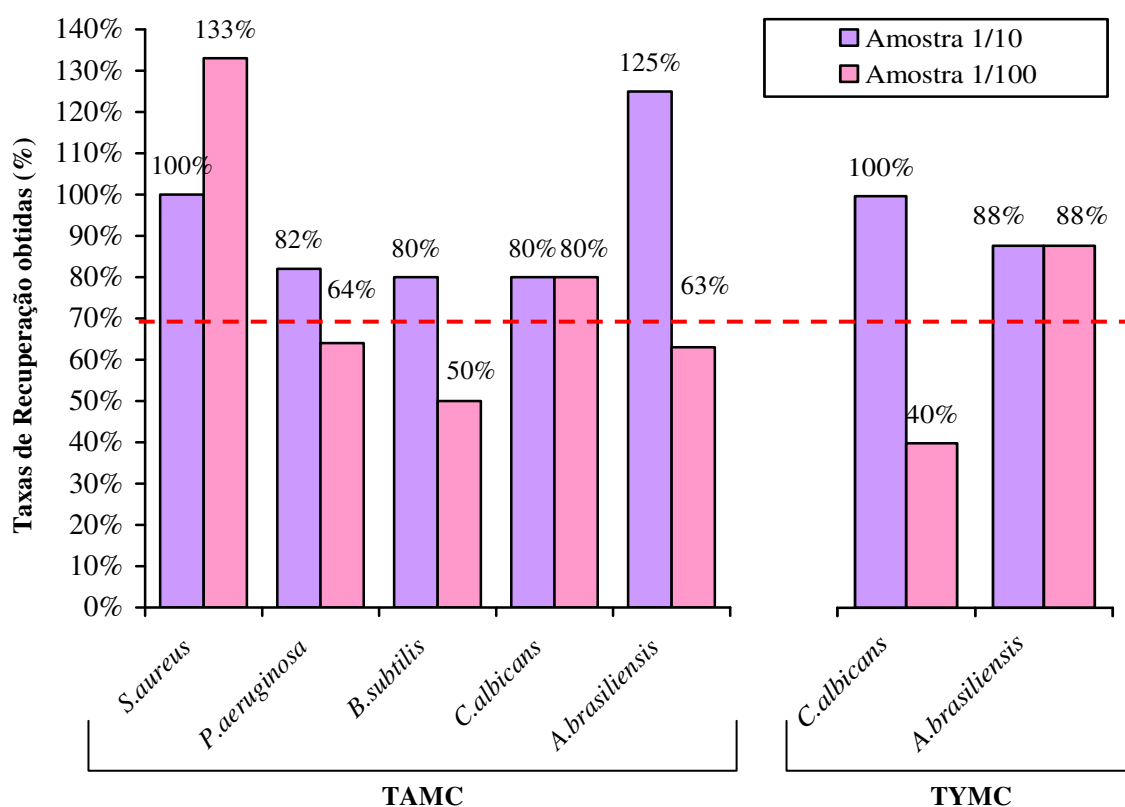
i) Corresponde ao inóculo adicionado à amostra preparada (1/10 e 1/100), UFC presentes em 10 mL de Produto C.

j) UFC esperados no volume de amostra filtrado (10 mL para amostra de 1/10 e 100 mL de amostra 1/100, que corresponde a 1 mL de Produto C (UFC no controlo de Suspensão/10).



Com base nos resultados obtidos (**Tabela XXVII**) foi determinada a Taxa de Recuperação por ensaio, para as duas diluições da amostra (**Gráfico VI**), tendo-se observado que apenas na amostra de diluição 1/10 as taxas de recuperação, para todos os microrganismos, foram superiores a 70%.

Com estes resultados, foi possível validar a utilização dos Testes de Enumeração microbiana, utilizando o método de filtração por membrana, na filtração de 10 mL de uma amostra de diluição 1/10 do Produto C. Eram esperadas taxas de recuperação semelhantes na amostra 1/100, no entanto estes valores pode ser explicados com o facto de ser ter utilizado uma baixa quantidade de inóculo, causando uma maior variabilidade de resultados em grandes volumes de amostra filtrada (100 mL).



**Gráfico VI:** Comparação das taxas de Recuperação obtidas na 2ª fase da Validação do método de filtração por membrana para Testes de Enumeração (TAMC e TYMC), com a amostra 1/10 e com a amostra 1/100. A tracejado vermelho - taxa de recuperação mínima para validação dos ensaios.

No que diz respeito ao inóculo, vem na EP (2011) e USP (2012) “Adicionar à amostra preparada (...) volume de suspensão microbiana suficiente, para obter um inóculo de não mais do que 100 UFC.”, o que significa que se pode adicionar mais de 100 UFC à amostra preparada, desde que na contagem do filtro não se obtenha mais do que 100 UFC. Mas,

### Testes de Promoção do Crescimento

tendo em conta as baixas quantidades de contaminação, observadas nas análises de rotina, optou-se pela inoculação de menos de 100 UFC em 10 mL de produto C, para verificar se uma concentração tão baixa neste produto seria detectada com a utilização do método. Mesmo sabendo, que está associado um maior erro na recuperação de UFC muito baixas, com os resultados obtidos, obtiveram-se taxas de recuperação superiores a 70%, taxas essas, que foram calculadas com base no obtido nas placas de controlo (mesmo inóculo adicionado à amostra).

Por fim, foi executada a 3ª fase do processo de validação, utilizando a amostra escolhida na fase anterior – diluição de 1/10 do Produto C, e à qual foi inoculada *E. coli*, para realização do Teste de Pesquisa de *E.coli* no Produto C. Apesar deste método não ter sofrido quaisquer alterações, a sua execução serviu para verificar se um inóculo de menos de 100 UFC adicionado a 10 mL de Produto C diluído, seria detectado.

Como se pode observar, com os resultados obtidos (**Tabela XXVIII**) o teste de Pesquisa de *E.coli* foi de encontro ao esperado, observando-se crescimento de colónias características de *E. coli* em MCA, dando por completa a validação do procedimento de análise microbiológica do Produto C.

**Tabela XXVIII:** Resultados obtidos nos testes de promoção de crescimento para validação do método utilizado na pesquisa de *E. coli* no Produto C – 3ª Fase.

Microrganismo	Teste	Controlo Suspensão (UFCmédio/volume de inóculo)	Resultados Observados
<i>E. coli</i>	Pesquisa de <i>E. coli</i>	23	Aparecimento de Colónias Rosas com precipitado nas placas de MCA, de acordo com o observado nos Testes de Promoção de Crescimento nesse meio, e dentro do tempo estipulado. ( <b>Anexo II, Figura A.II</b> )

A preparação, realização e análise desta validação permitiu demonstrar com é importante na construção de um processo de validação de métodos para a análise microbiológica de um produto, uma avaliação cuidada, caso a caso, das características do produto analisado e dos resultados esperados nos ensaios. Só assim, a validação vai permitir assegurar que o método irá detectar/quantificar a contaminação microbiológica existente no produto e que os resultados obtidos serão fiáveis.

Por fim, à ainda que referir a importância desta validação, na melhoria da metodologia utilizada na avaliação microbiológica do produto C, nos Laboratórios Atral, possibilitando uma análise mais ajustada às características do produto.

### 3.3.4 – Teste de Avaliação da Recuperação dos lotes de pastilhas

Os testes de avaliação da recuperação dos lotes de pastilhas, foram realizados nos novos lotes de pastilhas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *A. brasiliensis*, de modo a estandardizar o método utilizado na suspensão de microrganismos e obtenção de inóculo. Para isso, procedeu-se à suspensão, de uma pastilha liofilizada do lote de microrganismo, num volume apropriado de TSB, de modo a obter três volumes de inóculo entre 50 e 500 µL, com concentrações de microrganismo iguais ou inferiores a 100 UFC. (Tabela XIX)

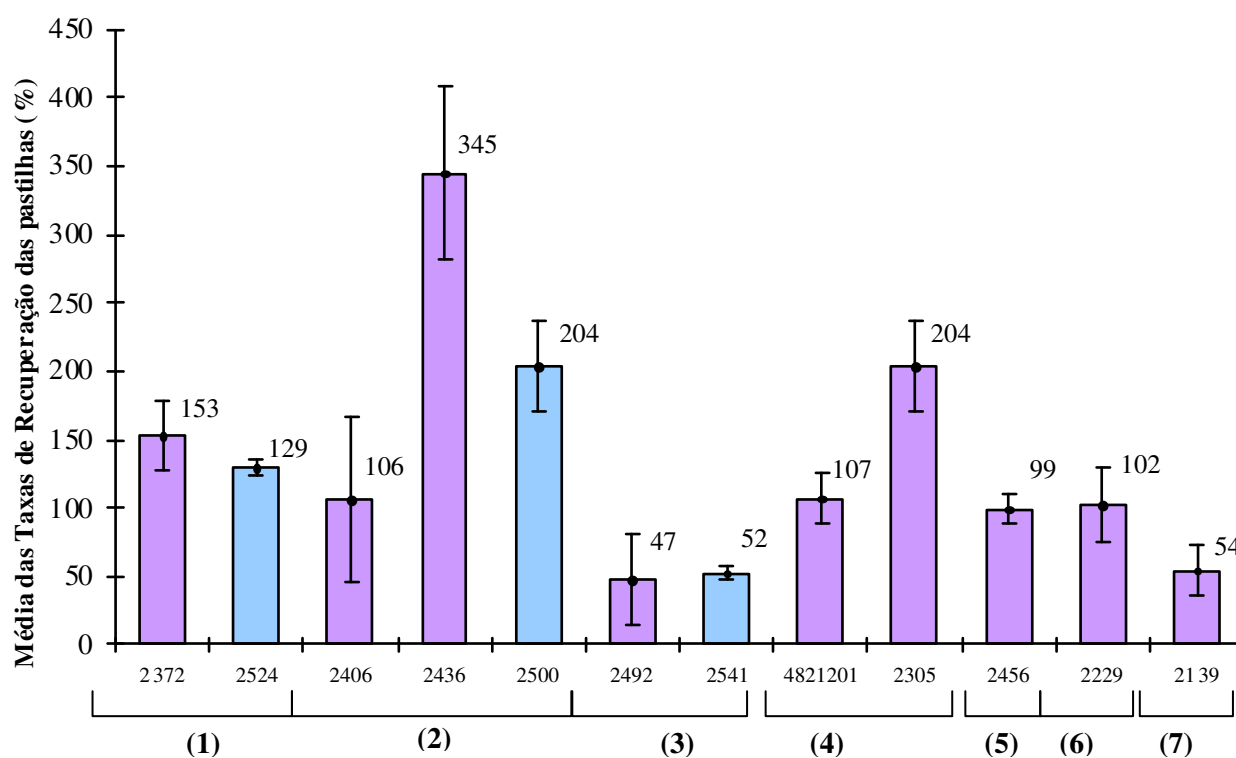
À excepção do inóculo obtido a partir do lote de pastilhas de *P. aeruginosa*, com um UFC alvo de 75, todos os outros, geraram resultados dentro do intervalo necessário ( $\leq 100$  UFC), tendo a escolha do volume de inóculo para utilização nos testes de promoção de crescimento de rotina, recaído sobre aqueles cuja a média de UFC obtida no ensaio, rondou os 50 UFC. (Tabela XXIX)

**Tabela XXIX:** Resultados obtidos nos Testes de Avaliação da Recuperação dos lotes de pastilhas de *S.aureus* (2534), *P. aeruginosa* (2500) e *A. brasiliensis* (2541). A azul, UFC alvo escolhido, atendendo aos resultados obtidos nos ensaios.

Microrganismo	Lote	UFC alvo	Média UFC obtida	Taxa de Recuperação
			no ensaio	da pastilha (%)
<i>S. aureus</i>	2534	22	35	159
		<b>50</b>	<b>66</b>	<b>132</b>
		75	95	127
<i>P. aeruginosa</i>	2500	<b>25</b>	<b>41</b>	<b>168</b>
		50	81	160
		75	108	135
<i>A. brasiliensis</i>	2541	50	25	50
		75	34	45
		<b>100</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

A preferência, na utilização de inóculos a rondarem os 50 UFC, deve-se a ligeiras variações que ocorrem entre as pastilhas utilizadas, minimizando a possibilidade de, num ensaio, se obter placas de controlo com valores acima dos 100 UFC.

Os resultados mostraram também, que as taxas de recuperação obtidas nos lotes de pastilhas, apesar de semelhantes entre si, para os vários inóculos utilizados, distanciaram-se sempre dos 100%, sendo superiores no caso de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e inferiores no caso de *A. brasiliensis*, ou seja, distanciaram-se do que se obteria (UFC alvo) atendendo ao que vem indicado no certificado do lote. Estas diferenças podem dever-se às condições experimentais, como o método, meios e reagentes utilizados para a suspensão das pastilhas utilizadas, que são por vezes diferentes do utilizado pelo fabricante no cálculo do número de UFC por pastilha, o que evidencia, mais uma vez, a necessidade desta avaliação.



**Gráfico VII:** Média e desvio padrão das taxas de Recuperação dos lotes de pastilhas, nos ensaios em que foram utilizadas: (1) *S. aureus*; (2) *P.aeruginosa*; (3) *A. Brasiliensis*; (4) *B. subtilis*; (5) *C. albicans*; (6) *C. sporogenes*; (7) *E.coli*. A azul, lote de pastilhas em que se efectuou o teste de avaliação da recuperação de pastilhas.

Foi também efectuado, um levantamento do histórico da taxa de recuperação obtida para cada pastilha utilizada nos Testes de Promoção de Crescimento (**Anexo III**), tendo-se calculado, com base nesses valores, a média e desvio padrão da taxa de recuperação de cada lote. (**Gráfico VII**) Com este levantamento, facilmente se consegue mostrar as discrepâncias encontradas entre o número de UFC indicado pelo certificado e o número de UFC obtido nas placas de controlo dos Testes de Promoção de Crescimento, uma vez que poucos foram os lotes com médias de recuperação próximas do 100%.

Outro dado interessante prende-se com a observação dos desvios padrão obtido para cada lote, em especial nos lotes de microrganismos em que foi feita a avaliação da taxa de recuperação antes da utilização em rotina. Tanto para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. brasiliensis*, os desvios padrão da taxa de recuperação nos lotes avaliados (**Gráfico VII**, barras azuis) foram claramente mais baixos, quando comparado com lotes utilizados anteriormente (**Gráfico VII**, barras lilás), uma vez que após avaliação, o método e inóculo utilizados foram sempre iguais.

Com base nestas observações, sugere-se que antes da utilização de um lote de pastilhas de um microrganismo, seja sempre efectuada uma avaliação desse lote e uma standardização do método utilizado.



## **CONCLUSÃO**





Este relatório, permitiu a descrição e discussão das principais actividades desenvolvidas e competências adquiridas durante o estágio, bem com, a importância do papel do operador na preparação, execução e análise das mesmas.

No controlo de qualidade microbiológica na indústria farmacêutica, alguns pontos são fundamentais em todos os testes realizados. Os registos efectuados, tanto antes, durante, como após o ensaio, são de grande importância para a avaliação dos resultados, bem como para a monitorização e controlo de qualidade dos ensaios realizados. Por sua vez, os ensaios, devem ter em conta os procedimentos e recomendações das farmacopeias, não só aquando da execução, mas também, na preparação dos materiais, reagentes e meios, e nas condições ambientais em que são executados.

Com os Testes de Esterilidade efectuados, foi possível fazer um estudo dos diferentes métodos empregados, dando ênfase ao método STERITEST. Foi também analisada, a performance do operador, face às regras e cuidados de esterilidade necessários, e o ambiente em que estes ensaios foram realizados – APA, evidenciando a importância destas monitorizações na análise dos ensaios e sugerindo possíveis melhorias no emprego destas.

A análise efectuada, aos Testes de Promoção de Crescimento realizados, permitiu fazer um levantamento dos critérios, interpretações e cuidados necessários no controlo de qualidade dos meios de cultura e em validações, para um melhoramento em futuras aplicações. Foi sobretudo, demonstrada a utilidade destes testes, na grande maioria das análises microbiológicas realizadas na indústria farmacêutica. As validações executadas tiveram também, um impacto importante para a empresa, pois possibilitaram a redução de custos, e melhoria de algumas metodologias.

A análise das metodologias executadas durante o estágio, mostra bem a importância do operador em todas as fases da análise microbiológica na indústria farmacêutica, e como é possível com este estudo, alterar e melhorar os procedimentos executados, para um maior rigor e confiança nos resultados obtidos. O operador deve, por isso, ser o principal crítico no que diz respeito ao trabalho que executa e às evidências observadas.

As principais dificuldades e limitações sentidas durante este percurso, prenderam-se com a impossibilidade temporal na realização e aprofundamento de algumas metodologias, nomeadamente a possibilidade de extensão de testes de promoção de crescimento para validação de mais metodologias para análise de produtos, consideradas importantes no melhoramento das análises efectuadas.

No entanto, foi de extrema importância a integração num grupo de trabalho empenhado e competente que promoveu o interesse por esta área de actividade, incansáveis no apoio prestado em todas as fases do estágio. Foi ainda possível, contactar com as dificuldades do dia-a-dia empresarial mas também com as ferramentas necessárias para ultrapassar essas mesmas dificuldades, que permitiram desenvolver e aprofundar as competências necessárias para a inserção numa actividade profissional.

Conclui-se, por isso, que os objectivos propostos aquando da realização deste estágio foram alcançados, não só pela aquisição de conhecimentos e metodologias de trabalho importantes no controlo de qualidade microbiológica na indústria farmacêutica, como também pelas sugestões propostas com a análise dos resultados obtidos, que no conjunto contribuíram para crescimento pessoal, científico e profissional.

***Um Microbiólogo é alguém que executa actos microbiológicos, que sabe a razão da forma como os actos são realizados, bem como, o seu valor para o paciente e a empresa.***

Sutton (2007), “*Who is a Microbiologist?*”

Foi na procura de executar, saber a razão e os valores dos actos microbiológicos na indústria farmacêutica, que avancei para a realização deste estágio, que sem dúvida me ajudou no alcance do objectivo de me tornar uma melhor Microbióloga.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Akers, M. J., Larrimore D. S., Guazzo D. M. (2002). *Parenteral Quality Control*. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 1-60.
- AtralCipan, Site Oficial. [www.atral.pt](http://www.atral.pt) (Visitado a 14-10-2011).
- Basu S, Pal A., Desai P.K. (2005) *Quality control of culture media in a microbiology laboratory*. Indian J Med Microbiol. 23:159-63.
- Bathgate, H.; Lazarri, D.; Cameron, H.; McKay, D. (1993). *The incubation period in sterility testing*. J. Parent. Sci. Technol. 47(5). 254-257.
- Besajew, V. C. (1992). *The Importance of the incubation time in the test for sterility*. Phurnz. Ind. 54(6). 539-542.
- Brewer, J. (1940) *A clear liquid medium for the "aerobic" cultivation of anaerobics*, J. Bacteriol., 39, 10.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, A. S. (2007). *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. 24<sup>th</sup> International Ed. United States: McGraw-Hill.
- Cundell, A. M. (2003). *The Utility of Growth-Promotion Testing of Microbiological Media*. BD Catapult, BD Diagnostic Systems, Vol. 4, Issue 2, USA.
- Decreto-Lei n.º 99/2000, de 30 de Maio. *Transpõe a Directiva n.º 87/18/CEE, do Conselho, de 18 de Dezembro de 1986, relativa à aplicação dos princípios da OCDE de boas práticas de laboratório (BPL) e ao controlo da sua aplicação para os ensaios sobre as substâncias químicas, e a Directiva n.º 99/11/CE, da Comissão, de 8 de Março, que adapta ao progresso técnico os princípios contidos naquela directiva*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Diário da Republica. Nº125 SÉRIE I-A. pp 2476-2485.
- Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto. Anexo I - Normas e protocolos analíticos, farmacotoxicológicos e clínicos em matéria de ensaios de medicamentos. *Estatuto do Medicamento - Estabelece o regime jurídico dos medicamentos de uso humano, transpondo a Directiva n.º 2001/83/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de Novembro, que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano, bem como as Directivas n.os 2002/98/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Janeiro, 2003/63/CE, da Comissão, de 25 de Junho, e 2004/24/CE e 2004/27/CE, ambas do Parlamento Europeu e do Conselho, de 31 de Março, e altera o Decreto-Lei n.º 495/99, de 18 de Novembro*. Ministério da Saúde. Diário da Republica. Nº 167 SÉRIE I. pp 6297-6383.
- EudraLex (2008). Annex 1 - Manufacture of Sterile Medicinal Products. *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use*; Volume 4; European Commission, Bruxelas.
- EudraLex (2012). Chapter 1 - Pharmaceutical Quality System. *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use*; Volume 4; European Commission, Bruxelas.
- EP (2010) Water Purified Monograph. *European Pharmacopoeia* 6.3. Strasbourg. Council of Europe. pp. 4344-4346.
- EP (2011) 2.6.1. Sterility Teste. *European Pharmacopoeia* 7.0. Strasbourg. Council of Europe. pp. 153-156.
- EP (2011) 2.6.12. Microbiological Examination of Non-sterile Products: Microbial Enumeration Tests. *European Pharmacopoeia* 7.0. Strasbourg. Council of Europe. pp. 163-167.

- EP (2011) 2.6.13. Microbiological Examination of Non-sterile Products: Test for Specified Micro-organisms. *European Pharmacopoeia* 7.0. Strasbourg. Council of Europe. pp. 167-171.
- EP (2011) 5.1.4 Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use. *European Pharmacopoeia* 7.0. Strasbourg. Council of Europe. p. 507.
- Fjeld, K.I. (2011) *The importance of microbiological quality control in the pharmaceutical industry*. Posted 9th June 2011 in Articles. General. Microbiotics, Inc. <http://www.pharmaphorum.com/2011/06/09/the-importance-of-microbiological-quality-control-in-the-pharmaceutical-industry/> (Visitado a 16-03-2012).
- Gordon, O., Gray, G.C., Anders, H., Staerk, A., Schlaefli, O., Neuhaus, O. (2011). *Overview of rapid microbiological methods evaluated, validated and implemented for microbiological quality control*. *European Pharmaceutical Review*. Vol. 16, Issue 2. USA.
- Gray, J.C., Morandell, D., Gapp, G., Le Goff, N., Neuhaus, G., Staerk, A. (2011). *Identification of microorganisms after milliflex rapid detection - a possibility to identify nonsterile findings in the milliflex rapid sterility test*. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. Vol. 65, Nº1. pp. 42-54.
- Hugo, W.B., Russel A.D. (1998). *Pharmaceutical Microbiology*. 6ª Ed. Blackwell Science Ltd. pp. 439-451.
- Macelino, I. (2012). *Conheça as empresas as farmacêuticas que mais apostam nas exportações*. Quem é quem na Indústria Farmacêutica. Suplemento. Diário Económico. Nº 5473. Pp IV-V.
- Miller, M.J. (2010). *Developing a Validation Strategy for Rapid Microbiological Methods*. *American Pharmaceutical Review*. Vol. 13, Issue 3. pp 28-33.
- Millipore Corporation. (2001). *Steritest™ Compact, Installation and Operation Manual*, Millipore Corporation. USA.
- Millipore Corporation (2002). *Sterisolutes™ User Guide* 2002 Millipore Corporation. USA.
- Millipore Corporation (2004). *Steritest™ EZ Sterility Testing Devices*, Data Sheet. Millipore Corporation. USA.
- Millipore Corporation. *Steritest EZ Devices for Antibiotics and Products with Antimicrobial Activity*. <http://www.millipore.com/catalogue/module/C10688> (visitado a 25-09-2011).
- Moldenhauer, J., Sutton, S.V. (2004). *Towards an Improved Sterility Test* *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. Vol. 58, Nº. 6. pp. 284-286.
- Nagel, J. G., Kunz, L.J. (1973). *Needless Retesting of Quality-Assured, Commercially Prepared Culture Media*. *Applied Microbiology*. USA. Vol. 26, Nº1. pp 31-37.
- Parveen, S., Kaur, S., David, S.A., Kenney, J.L., McCormick, W.M., Gupta, R.K. (2011). *Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products*. *Vaccine*. Vol. 29, Nº45, pp. 8012-8023.
- PIC/S (2007). *Recommendation on isolators used for aseptic processing and sterility testing*. PI 014-3. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Pharmaceutical Inspection Convention.
- PIC/S (2007). *Recommendation on Sterility Testing*. PI 012-3. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Pharmaceutical Inspection Convention.



- Pincus, D. H. (2006) Microbial Identification Using the bioMérieux VITEK® System. Chapter 1. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Edited by Michael Miller. PDA Technical Book. PDA. pp 1-32.
- Richter S.G. (2011). *Sterility Testing – Essential Thing You must Know*, A white paper. Microtest Laboratories, Inc., USA.
- Riley, B.S. (2004). *Rapid Microbiology Methods in the Pharmaceutical Industry*. American Pharmaceutical Review. USA.
- Sandle, T. (2011). *Sterility Test Requirements for Biological Products*. Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter – Vol. 17, Nº 8.
- Sandle, T. (2012). *Assessment of Culture Media in Pharmaceutical Microbiology*. Pharmaceutical microbiology. [http://www.pharmamicro.com/2012/04/assessment-of-culture-media-in.html?goback=%2Egde\\_92965\\_member\\_105403581](http://www.pharmamicro.com/2012/04/assessment-of-culture-media-in.html?goback=%2Egde_92965_member_105403581) (visitado a 03-07-2012).
- Sandle, T. (2012). *Introducing Pharmaceutical microbiology and Pharmig*. Innovation Into Success. The quarterly journal of UKSPA, United Kingdom Science Park Association – Issue nº9, p. 35.
- Stärk, A., Vogt, C. (2012). *Microbiology in Filling and Sterility Test Isolators*. American Pharmaceutical Review. USA.
- Sutton, S. (2005). *Validation of Alternative Microbiology Methods for Product Testing Quantitative and Qualitative Assays*. Pharmaceutical Technology. Vol. 29, Nº4. pp 118-122.
- Sutton, S. (2006). *Quality Control of Microbiological Culture Media*, Pharmaceutical Microbiology Fórum. Newsletter – Vol. 12, Nº1. pp 2-5, 11.
- Sutton, S. (2007). *Who is a Microbiologist?*, Pharmaceutical Microbiology Fórum. Newsletter – Vol. 13, Nº5. pp 6,7, 9-11.
- Sutton, S., Singer, D. C. (2011) Microbiological Best Laboratory Practices, USP <1117> Value and Recent Changes to a Guidance of Quality Laboratory Practices. American Pharmaceutical Review. Vol.14, Issue 4. USA.
- USP (2012) <71> Sterility Tests. *United States Pharmacopoeia 35*. Second Supplement USP 35-NF30. The United States Convention. Rockville. MD. pp 65-70.
- USP (2012) <85> Bacterial Endotoxins Teste. *United States Pharmacopoeia 35*. The United States Convention. Rockville. MD. pp 5625-5629.
- USP (2012) <1113> Microbial Characterization, Identification, and Strain Typing. *United States Pharmacopoeia 35*. The United States Convention. Rockville. MD. pp 694-697.
- USP (2012) <1116> Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments. *United States Pharmacopoeia 35*. The United States Convention. Rockville. MD. pp 697-707.
- USP (2012) <1117> Microbiological Best Laboratory Practices. *United States Pharmacopoeia 35*. The United States Convention. Rockville. MD. pp 707-712.
- USP (2012) <1223> Validation of alternative microbiological methods. *United States Pharmacopoeia 35*. The United States Convention. Rockville. MD. pp. 873-875.

USP (2012) <1225> Validation of compendial procedures. *United States Pharmacopoeia* 35. The United States Convention. Rockville. MD. pp 877-881.

USP (2012) <1227> Validation of Microbial Recovery from pharmacopeial articles. *United States Pharmacopoeia* 35. The United States Convention. Rockville. MD. Pp 883-885.

WHO (2011) World Health Organization. *WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories*, Annex 2. WHO Technical Report Series, No. 961.

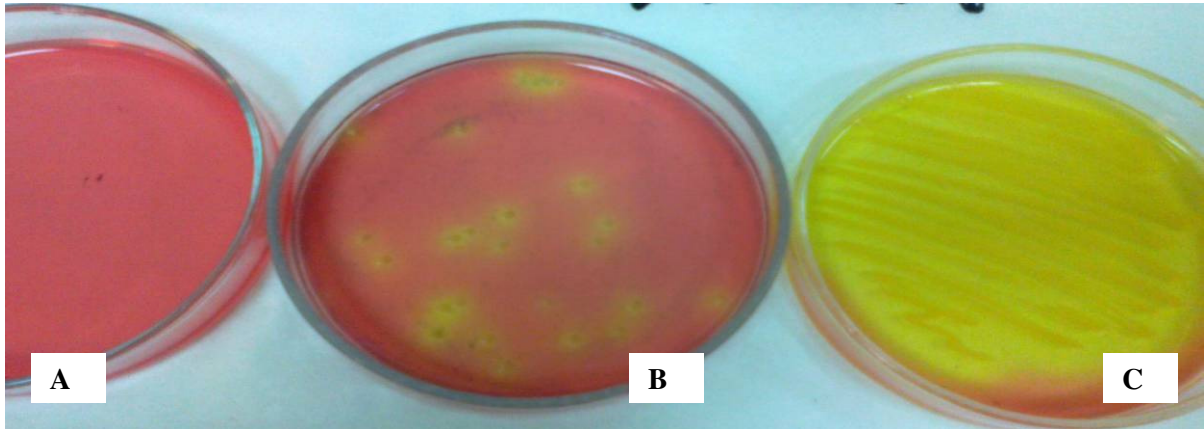
**ANEXOS**



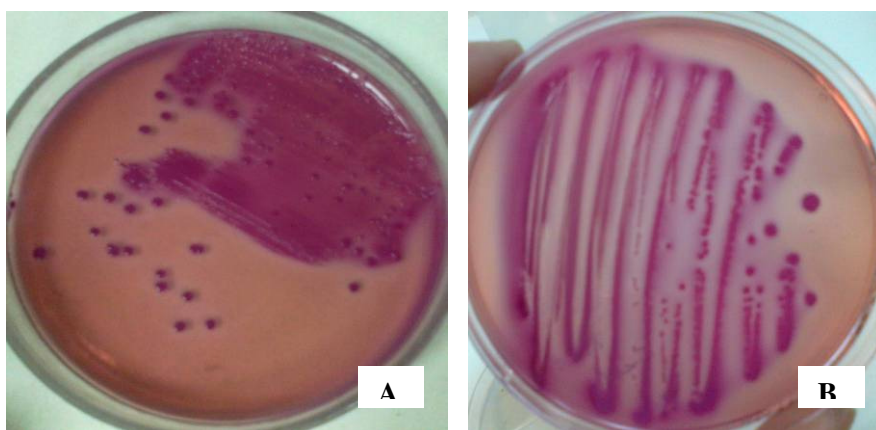




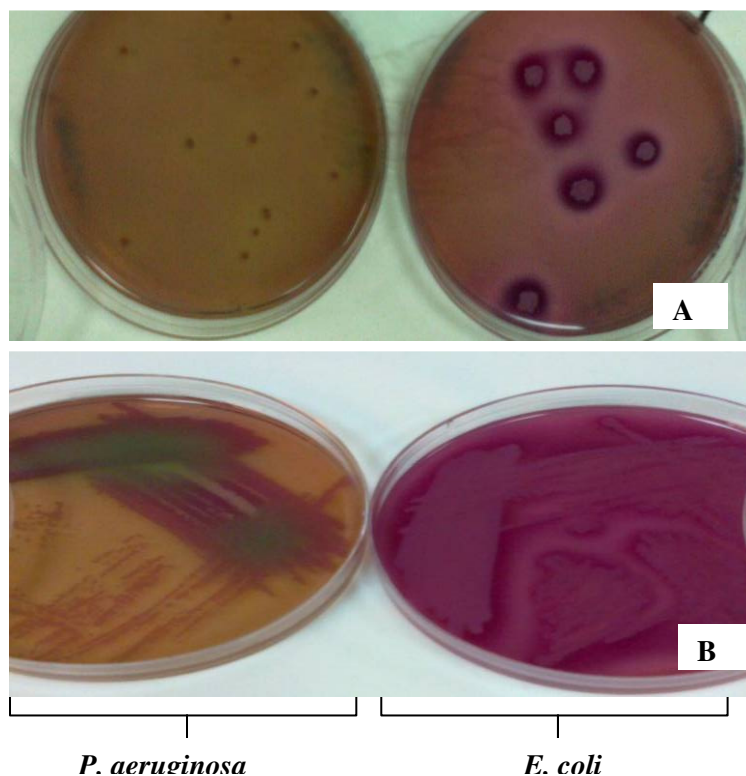
## **Anexo II – Propriedades Indicativas observadas nos Testes de Promoção de Crescimento aos meios de cultura selectivos.**



**Figura A.I:** Teste de Promoção de Crescimento e de Propriedades Indicativas em MSA, meio selectivo e diferencial para isolamento e enumeração de estafilococos: (A) Branco do MSA; (B) Características das colónias de *S.aureus* no Teste de Promoção de Crescimento; (C) Características do crescimento de *S. aureus*, após repicagem. Colónias amarelas rodeadas por uma zona amarela, devido á fermentação de manitol.



**Figura A.II:** Teste de Promoção de Crescimento e de Propriedades Indicativas em MCA, meio selectivo e diferencial que permite a detecção de bactérias Gram negativas entéricas: (A); Características do crescimento de *E. coli*, após repicagem em meio MCA (meio desidratado, preparado em laboratório); (B) Características do crescimento de *E. coli*, após repicagem, em meio MCA (placas, BioMerieux). Colónias rosa com formação de precipitado á volta das colónias.



**Figura A.III:** Teste de Promoção de Crescimento e de Propriedades Indicativas em VRBG: (A) Características observadas no Teste de Promoção de Crescimento com *P. aeruginosa* (não fermenta a glucose, observando-se o aparecimento de colónias transparentes a rosas, sem precipitado) e *E. coli* (por fermentar a glucose forma colónias grandes violetas, com precipitado), (D) Características do crescimento de *P. aeruginosa* e *E. coli* em VRBG. Após repicagem aparecimento de zonas esverdeadas nas placas com *P.aeruginosa*, estas zonas devem-se ao facto desta espécie produzir pigmentos solúveis (pioverdina e piocianina).



**Anexo III – Taxa de Recuperação das Pastilhas utilizadas nos Testes de Promoção de Crescimento.**

**Tabela A.III:** Taxa de Recuperação das pastilhas das estirpes utilizadas nos Testes de Promoção de Crescimento, fracção entre a média de UFC nas placas de controlo como o inóculo alvo (calculado com base no número de UFC por pastilha que vem no certificado). Total de pastilhas utilizadas, média e desvio padrão das Taxas de Recuperação por lote.

	SA <sup>e)</sup>		PA <sup>f)</sup>			AB <sup>g)</sup>		BS <sup>h)</sup>		CA <sup>i)</sup>	CS <sup>j)</sup>	EC <sup>k)</sup>	
Lote	2372	2524	2406	2436	2500	2492	2541	482	1201	2305	2456	2229	2139
Percentagem (%) de Recuperação das pastilhas utilizadas nos Testes de Promoção de Crescimento	131	132	370	280	168	40	50	104	99	90	147	26	
	118	132	112	360	252	48	50	108	222	92	104	84	
	120	132	190	390	216	23	48	136	174	97	79	51	
	132	130	132	322	208	13	59	104	231	80	116	50	
	147	118	34	436	192	17		82	186	96	105	60	
	127		64	388	176	34			222	106	107	52	
	148			346	252	87			184	107	58		
	138			400	160	75			216	91	96		
	152			341	208	120			212	110	103		
	164			425		58			240	86	109		
	164			316		40			200	96	138		
	170			341		17			204	106	116		
	191			191		29			196	114	106		
	170			291					200	92	80		
	168								228	122	100		
	140								200	105	128		
	174								216		120		
	190								250		110		
	170										20		
	162										104		
130										102			
168													
190													
100													
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>18</b>	<b>16</b>	<b>21</b>	<b>6</b>	
<b>Média</b>	153%	129%	106%	345%	204%	47%	52%	107%	204%	99%	102%	54%	
<b>Desvio Padrão</b>	25%	6%	60%	64%	33%	33%	5%	19%	33%	11%	27%	19%	

Legenda:

e) – *S. aureus*;

i) – *C. albicans*;

f) – *P. aeruginosa*;

j) – *C. sporogenes*;

g) – *A. brasiliensis*;

k) – *E. coli*;

h) – *B. subtilis*;



