

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Estudo para validação de método rápido
microbiológico aplicado a teste de esterilidade:
técnica de bioluminescência de ATP**

Aline Marinho Picanço

Dissertação apresentada para obtenção de Grau de
Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Estudo para validação de método rápido
microbiológico aplicado a teste de esterilidade:
técnica de bioluminescência de ATP**

Aline Marinho Picanço

Dissertação apresentada para obtenção de Grau de
Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

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

P585e Picanço, Aline Marinho
Estudo para validação de método rápido microbiológico aplicado
a teste de esterilidade : técnica de bioluminescência de ATP /
Aline Marinho Picanço. -- São Paulo, 2014.
67p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Droga : Controle microbiológico de qualidade 2. Esterilidade :
Testes 3. Bioluminescência I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus
Andreoli, orientador.

615.19015 CDD

Aline Marinho Picanço

Estudo para validação de método rápido microbiológico aplicado a teste de esterilidade: técnica de bioluminescência de ATP

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção de título de Mestre

**Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora/Presidente**

1º examinador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Ubiratã Oliveira, pelo amor, paciência e incentivo mesmo nos momentos mais difíceis: sem seu apoio, este trabalho não seria possível.

À minha família pelo exemplo e por, mesmo com a distância, sempre terem uma palavra de conforto, tornando a saudade um pouco menos dolorida.

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, por toda a confiança, carinho e exemplo pessoal e profissional, além do incentivo constante; por sempre tentar mostrar o melhor caminho com seu otimismo e alegria. Muito obrigada.

Ao colega Wesley Oliveira: sua ajuda foi essencial neste trabalho.

À Andreia Grigoletti e Gabriela Conti pelo apoio e ajuda ao longo do trabalho.

À Dra. Adriana Bugno e equipe do Instituto Adolfo Lutz, por toda colaboração e dedicação a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço pela ajuda e incentivo.

À Profa. Dra. Irene Satiko Kikuchi e equipe do CONFAR, por todos os momentos de apoio e troca de conhecimentos.

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

À Baxter Hospitalar por todo apoio material, pessoal e incentivo ao trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro na modalidade de bolsa de estudos sem o qual este trabalho não teria sido possível.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar; mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.”*

(Madre Teresa de Calcutá)

PICANÇO, A.M. **Estudo para validação de método microbiológico rápido aplicado a teste de esterilidade: técnica de bioluminescência de ATP.** 2014. 67 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de desenvolvimento e validação do método microbiológico rápido empregando a técnica de bioluminescência de Adenosina Trifosfato (ATP) como método alternativo para o teste de esterilidade. O ATP reage com o sistema enzimático luciferina/luciferase e gera um fóton de luz em presença de íons magnésio, reação que pode ser utilizada na detecção de microrganismos. A luz gerada na reação é medida por um dispositivo chamado luminômetro, que traduz o sinal em unidades relativas de luz (URL), metodologia altamente sensível que pode ser utilizada na análise de produtos estéreis com o objetivo de diminuição no tempo do ensaio. Enquanto a turbidez do meio de cultura só pode ser visualizada quando o contaminante chega à concentração de 10^6 UFC/mL, a tecnologia de bioluminescência de ATP pode detectar amostras com concentração em torno de 10^4 UFC. Foram empregados na validação dados obtidos a partir do método tradicional de esterilidade (técnica de filtração) realizado paralelamente ao método alternativo. As soluções parenterais utilizadas nos ensaios foram: solução fisiológica 0,9%; solução de dextrose 5%; Ringer lactato; e solução de metronidazol 0,5%. As soluções-teste foram inoculadas intencionalmente com suspensões microbianas preparadas através da diluição de *Bioballs*[®], com concentrações de 10 UFC/100 mL, 2 UFC/100 mL e 0,4 UFC/100 mL. Após a realização do teste convencional, as membranas resultantes do ensaio foram incubadas nos meios de cultura caldo caseína de soja e tioglicolato. Alíquotas destes meios foram retiradas após 96 horas de incubação para análise pelo método alternativo. Os seguintes microrganismos foram selecionados para o estudo: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Aspergillus brasiliensis*, *Kocuria rosea* e *Micrococcus luteus*. A análise dos resultados obtidos mostrou que o método alternativo é capaz de detectar os microrganismos testados. Quanto à sensibilidade, o método alternativo apresentou vantagem na concentração 2 UFC/100 mL, e equivalência nas outras concentrações. A não interferência dos diferentes produtos e meios nos resultados encontrados permite vislumbrar evidência de robustez do método. Adicionalmente, em relação ao tempo de resposta, o método alternativo demonstrou ser equivalente ao convencional (p-valor=0,43).

Palavras-chave: Validação; Método Microbiológico Rápido; Teste de Esterilidade; Bioluminescência de ATP.

PICANÇO, A.M. **Validation of rapid microbiological method applied to sterility test: ATP bioluminescence technique.** 2014. 67 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ABSTRACT

This study is being conducted with a goal of validating and developing the fast microbiological method of ATP bioluminescence, as an alternative method to the sterility test. The ATP reacts with the enzymatic system luciferin-luciferase and produces light in the presence of magnesium ions, this reaction can be used for microorganism's detection. The light generated in this reaction can be measured by a device called luminometer that translates the signal in relative light units (RLU). This methodology has high sensibility and it can be used in the sterile products analysis with the objective of reducing the time of the sample. While the turbidity of the culture medium it can be visualized just when the sample reaches a concentration of 10^6 CFU per mL, the bioluminescence assay can detect samples at concentrations around 10^4 CFU per mL. The both methods, conventional (filtration technique) and alternative were done in parallel and the result data were used in the validation study. It was used in the assay the next parenteral solutions: physiological solution 0.9%, metronidazole solution 0.5%, dextrose solution 5% and Ringer lactate. The test solutions were inoculated with the microorganism suspensions, prepared by the dilution of the *Bioballs*[®] with result concentrations of 10 CFU/100 mL, 2 CFU/100 mL and 0.4 CFU/ mL. After the conventional test was performed, the result membranes were incubated in thioglicollate and soybean casein broth. After 96 hours of incubation, aliquots from the broth were taken to perform the analysis by the alternative method. The following microorganisms were selected to perform the validation study: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, *Kocuria rosea* and *Micrococcus luteus*. The analysis of results shows that the alternative method can detect the test microorganisms. Regarding of the sensibility, the alternative method shows advantage in the 2 CFU/mL inoculum concentration and equivalence in the other two concentrations. The method shows evidence of robustness because the results were not affected by the products or culture media used in the assay. Additionally concerning the detection time, the alternative method was established equivalent to the conventional method (p-value=0.43).

Keywords: Validation; Rapid Microbiological Methods; Sterility Test; ATP Bioluminescence.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Teste de esterilidade.....	4
2.1.1 Métodos de inoculação.....	5
2.1.2 Tempo e temperatura de incubação.....	6
2.1.3 Meios de cultura.....	7
2.1.4 Processo de amostragem e representatividade da amostra.....	8
2.1.5 Condições para realização do teste de esterilidade.....	11
2.1.6 Interpretação de resultados.....	15
2.1.7 Liberação paramétrica.....	16
2.2 Métodos microbiológicos rápidos.....	17
2.2.1 Tipos de métodos microbiológicos rápidos.....	19
2.2.2 Técnica de bioluminescência de ATP aplicada ao teste de esterilidade.....	22
2.3 Validação de métodos microbiológicos rápidos qualitativos.....	26
3. OBJETIVOS.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Soluções parenterais de grande volume.....	31
4.2 Meios de cultura.....	31
4.3 Microrganismos de escolha.....	32
4.4 Validação do teste de esterilidade.....	33
4.5 Teste de esterilidade convencional.....	34
4.5.1 Teste de esterilidade convencional com solução de metronidazol.....	35
4.6 Teste de esterilidade pelo método alternativo.....	35
4.7 Amostragem aplicada aos parâmetros de validação.....	36
4.8 Critérios para análise dos resultados.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Controle de qualidade das <i>Bioballs</i> [®]	38
5.2 Resultado do monitoramento ambiental da sala de trabalho.....	39
5.3 Avaliação da especificidade.....	40

5.4	Avaliação de limite de detecção.....	40
5.5	Avaliação estatística de equivalência.....	43
6.	DISCUSSÃO.....	46
7.	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Probabilidade de detecção de amostras contaminadas em relação ao percentual de unidades contaminadas.....	10
Tabela 2.	Classificação ISO de ambientes controlados.....	11
Tabela 3.	Limites máximos de contaminação microbiana.....	14
Tabela 4.	Resultado do controle de qualidade das <i>Bioballs</i> [®] – lotes B1975, B2212, B2317, B1948, B2304 e B2133.....	38
Tabela 5.	Certificado de análise fornecido pelo fabricante correspondente às <i>Bioballs</i> [®] – lotes B1975, B2212, B2317, B1948, B2304 e B2133 – e comparação com as médias obtidas.....	38
Tabela 6.	Número de resultados positivos e percentual de detecção das amostras contaminadas de solução fisiológica 0,9%.....	41
Tabela 7.	Número total de positivos e número de testes executados nos métodos convencional e Celsis Advance [™] AmpiScreen [™]	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desvio encontrado entre as médias do certificado de análise e as médias observadas experimentalmente nas <i>Bioballs</i> [®] – lotes B1975, B2212, B2317, B1948, B 2304 e B2133.....	39
Figura 2.	Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo <i>Candida albicans</i>	41
Figura 3.	Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figura 4.	Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo <i>Aspergillus brasiliensis</i>	42
Figura 5.	Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo <i>Clostridium sporogenes</i>	42
Figura 6.	Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo <i>Bacillus subtilis</i>	43
Figura 7.	Comparação entre as diferenças apresentadas na proporção de detecção entre os métodos convencional e alternativo nas diferentes concentrações de inóculo (C1, C2 e C3) e nos microrganismos testados.....	44
Figura 8.	Demonstração dos cálculos do programa Minitab 16.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Número de artigos a serem testados em relação ao número de artigos do lote de produto.....	9
Quadro 2.	Parâmetros de validação exigidos de acordo com as características do método analítico.....	28
Quadro 3.	Composição do meio tioglicolato.....	31
Quadro 4.	Composição do meio caseína de soja.....	32
Quadro 5.	Microrganismos selecionados para o ensaio.....	32
Quadro 6.	Condições de incubação das amostras.....	35
Quadro 7.	Resultados do monitoramento ambiental pelo método de amostragem passiva de ar, por um período de dois meses, da sala onde foram realizados os testes de esterilidade.....	39

LISTA DE SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
HEPA	High Efficiency Particulate Air (Filtros de Alta Eficiência)
ISO	International Standard Organization
PAT	Process Analytical Technology (Tecnologia Analítica em Processo)
PCR	Polimerase Chain Reaction
PDA	Parenteral Drug Association
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
URL	Unidades Relativas de Luz

1. INTRODUÇÃO

Produtos para uso parenteral são produzidos sob condições rigidamente controladas devido ao fato de entrarem em contato com regiões estéreis do corpo, como a corrente sanguínea, e não podem ser portadores de contaminação microbiana; a característica de esterilidade é exigida para que o risco de contaminação aos usuários seja descartado.

A liberação de lotes contendo produtos contaminados oferece risco aos pacientes, além de causar prejuízos financeiros à empresa. Dessa forma, para minimizar o risco de falhas no processo, além da validação do método de esterilização utilizado na fabricação, deverão ser efetuados a análise de risco do processo e o monitoramento das condições ambientais da produção.

O teste de esterilidade foi introduzido em 1932 pela *British Pharmacopeia* 32, com o objetivo de ser uma ferramenta auxiliar na avaliação da qualidade de produtos estéreis. Atualmente, no que concerne à abordagem técnica deste teste, os compêndios oficiais recomendam dois métodos: direto e indireto, sendo que a escolha do método adequado dependerá das características do produto em questão.

Em relação aos meios de cultura selecionados para o ensaio, considerou-se a importância fundamental destes para o sucesso na recuperação de microrganismos que possam estar presentes na amostra-teste. Além de meios de cultura adequados, a temperatura de incubação deve ser ótima para o crescimento de diferentes microrganismos.

Apesar de promover segurança aos consumidores e aos produtores, o teste de esterilidade convencional apresenta algumas limitações analíticas, uma vez que, por se tratar de um ensaio destrutivo, não é possível testar todas as unidades, sendo necessário o desenvolvimento de um plano amostral adequado. Ainda com relação às limitações deste teste, não é possível afirmar que este seja capaz de recuperar todos os microrganismos que possam estar

na amostra, pois microrganismos que sofreram agressão subletal podem apresentar dificuldades de crescimento nos meios de cultura convencionais.

Segundo as monografias oficiais, é necessário um período de incubação 14 dias para a liberação de resultado do teste de esterilidade. Se a amostra apresentar contaminação, alíquotas da mesma devem ser retiradas para identificação dos microrganismos contaminantes. No caso de comprovação de falha no teste de esterilidade pode ser efetuado reteste e, dessa forma, o prazo para liberação do lote pode ultrapassar 21 dias.

Contudo, o setor farmacêutico tem exigido tempos de resposta curtos com o intuito de possibilitar ações corretivas efetivas imediatas, minimizando perdas na produção. Neste contexto, o tempo exigido para liberação de resultados do teste de esterilidade se torna um fator limitante e, assim, a adoção de métodos microbiológicos rápidos ou alternativos é de fundamental importância. Essas técnicas foram introduzidas inicialmente na indústria cosmética e alimentícia com a proposta de liberação de resultados mais rápida, e não se baseiam apenas em enriquecimento e contagem de microrganismos, utilizando, também, tecnologias baseadas em reações bioquímicas, corantes vitais e detecção de produtos do metabolismo microbiano, entre outras.

Apesar das suas vantagens, a transferência de tecnologia dos métodos rápidos para o setor farmacêutico não ocorreu da forma imediata almejada: na década passada, muitos dos equipamentos não eram adequados às exigências específicas da indústria farmacêutica, sendo que o setor regulatório também manteve cautela quanto à aprovação destas novas tecnologias em função da escassa informação disponível com relação à sua adequação e validação.

Muitos destes obstáculos vêm sendo superados ao longo do tempo com a publicação de guias oficiais, livros e artigos sobre o tema, tornando os métodos rápidos uma opção interessante para empresas que buscam dinamizar seus processos produtivos.

Dentre as novas técnicas, encontra-se a bioluminescência de Adenosina Trifosfato (ATP), que utiliza a reação enzimática entre a luciferina e luciferase para gerar luz em presença de ATP. Essa reação ocorre naturalmente no vagalume *Photinus pyralis* e, baseando-se no princípio de que todo microrganismo vivo utiliza ATP como fonte de energia, o uso dessa reação para detecção microbiana surge como opção.

Métodos empregando esta tecnologia possuem alta sensibilidade e são adequados à análise de produtos de baixa carga microbiana. Para averiguar se o método atende aos requisitos necessários para determinar a esterilidade de produtos, é preciso que ele seja validado de acordo com os parâmetros recomendados pelas monografias oficiais. Dessa forma, devem ser avaliadas as características de cada método em paralelo e devem ser fornecidas evidências de que o método alternativo é equivalente ou superior ao tradicional.

Nesse sentido, o presente estudo contribuirá com o desenvolvimento de parâmetros de validação para o emprego do método rápido de bioluminescência de ATP no teste de esterilidade com o mesmo nível de confiança assegurado pelo teste tradicional.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Teste de esterilidade

Esterilidade, definida como a ausência de organismos vivos capazes de reprodução, é uma característica essencial em produtos destinados a uso parenteral. Diferentemente da administração enteral, a parenteral não passa pelas defesas naturais do organismo, portanto a injeção de produtos contaminados com organismos vivos pode trazer sérios prejuízos à saúde dos pacientes, especialmente aqueles com sistema imunológico comprometido (AKERS, LARRIMORE, GUAZZO, 2003; HALLS, 2002).

Produtos destinados ao uso parenteral devem ser submetidos ao teste de esterilidade que, conceitualmente, só é capaz de determinar se o artigo testado está estéril no momento em que o mesmo é realizado, após, ou antes, disso não é possível determinar tal característica. Ainda, a natureza destrutiva do teste torna necessário o emprego de um plano amostral, no qual apenas um número limitado de amostras será analisada e, sendo que o resultado do teste será extrapolado para o lote (BRONW, GILBERT, 1977).

Empregado como um dos parâmetros para liberação de lotes, o teste de esterilidade é capaz de detectar altos níveis de contaminação, mas apresenta limitações à detecção de baixos níveis. Para tanto, seria necessário que a amostra fosse demasiado grande, o que configura um impeditivo econômico (BRYCE, 1956; AVALLONE, 1985; AKERS, AGALLOCO, 1997; ALISSON, 1999; AKERS, LARRIMORE, GUAZZO, 2003; SUTTON, 2010).

É importante destacar que as limitações estatísticas do teste não devem ser agravadas por uma metodologia falha e, portanto, é necessário que as condições de teste sejam ótimas para que se evite a contaminação pelo ambiente ou operador, que deve ser treinado e continuamente avaliado de forma a garantir a técnica asséptica. O produto deve ser inoculado em meios de cultura que proporcionem condições de crescimento à uma extensa gama de

microrganismos, com temperatura, pressão de oxigênio e pH adequados (BAGHATE *et al.*, 1993; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

A introdução do teste de esterilidade em monografias oficiais ocorreu primeiramente em 1932, pela *British Pharmacopeia*, e desde lá tem sofrido modificações em seu tempo de incubação, meios de cultura e método de inoculação. Isso se deve a preocupação inerente à melhoria dos testes e visa verificar com maior segurança e qualidade a produção de medicamentos estéreis e produtos para saúde, levando-se em consideração o aspecto probabilístico da esterilização e o risco de recontaminação (PITTMAN, 1946; BUGNO, 2001).

2.1.1 Métodos de inoculação

Existem dois métodos de inoculação de amostra no meio de cultura, método direto e método indireto. No primeiro ocorre a transferência de certo volume de amostra diretamente ao meio de cultura adequado, enquanto no segundo ocorre a filtração da amostra através de uma membrana filtrante com 0,45 µm de diâmetro de poro que, após esta operação, é seccionada e inoculada nos meios de cultura adequados (BRITISH PHARMACOPEIA, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

A quantidade de amostra no método direto deve ser representativa, sendo esta transferida por espátulas ou pipetas conforme sua natureza. Caso o produto possua conservantes ou compostos que possam apresentar atividade antimicrobiana, estes devem ser neutralizados com reagente apropriado para que o resultado do teste não seja afetado (BUGNO, 2001; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

O teste de esterilidade por método indireto apresenta vantagens em relação ao método direto quando se deseja filtrar grandes volumes de amostra

e quando a amostra contém antimicrobianos que não são passíveis de inativação. Contudo, uma vez que, neste método ocorre maior manipulação da amostra, há mais risco de erros analíticos por contaminação acidental e, portanto, o nível de treinamento dos operadores deve ser maior.

A escolha do método, enfim, deve considerar fatores como a natureza da amostra, disponibilidade de recursos e condições de trabalho (BOWMAN, 1966; CALHOUN, WHITE, BOWMAN, 1970; BUGNO, 2001).

2.1.2 Tempo e temperatura de incubação

Inexiste temperatura de incubação ideal para promover o crescimento de todos os microrganismos, sendo que a maioria dos contaminantes de produtos farmacêuticos crescem mais rapidamente a 37 °C que a baixas temperaturas. Entretanto, temperaturas em torno de 23 °C podem revelar a presença de microrganismos que não cresceriam em outras condições, como fungos, que apresentam temperatura ótima para crescimento em torno de 20-25 °C (BROWN, GILBERT, 1977; MARSHALL, POULSONN-COOK, MODENHAUER, 1998). Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) a temperatura de incubação das amostras deve ser de 32,5 ± 2,5 °C para o meio de cultura tioglicolato e 22,5 ± 2,5 °C para o meio caseína de soja.

É essencial que haja um período de incubação adequado para que os microrganismos cresçam a níveis detectáveis, e este tempo varia dependendo da duração da fase *lag* do organismo, estágio de crescimento no qual o organismo ainda está se adaptando ao novo ambiente. Geralmente a fase *lag* dura apenas algumas horas, mas se estiverem presentes esporos, contaminantes de crescimento lento ou organismos que têm fase *lag* longa, pode ser necessário mais tempo para o crescimento. Microrganismos que sofrem agressão subletal podem apresentar fases *lag* longas, pois o tipo e a intensidade do estresse são os principais fatores que influenciam a duração

desta fase (BAGHATE *et al.*, 1993; AKERS, LARRIMORE, GUAZO, 2003; BUGNO, 2001; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Independentemente do método de inoculação utilizado, as farmacopeias recomendam 14 dias de incubação para o teste de esterilidade, para que microrganismos de crescimento lento e injuriados sejam capazes de se multiplicar no meio de cultura (BAGHATE *et al.*, 1993; AKERS; LARRIMORE; GUAZO, 2003, EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

2.1.3 Meios de cultura

Fatores como pH, composição do meio e presença de agentes inativadores são essenciais quando considerado o sucesso do teste de esterilidade (TIRUMALAI, 2005). Os meios de cultura devem apresentar condições favoráveis para que microrganismos que foram expostos a condições de estresse tenham capacidade de se desenvolver no tempo determinado pelo teste (BUGNO, 2001; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

Dois meios de cultura são descritos pelos compêndios oficiais como adequados para o teste de esterilidade, tioglicolato e caseína de soja, sendo que o primeiro promove preferencialmente crescimento de bactérias anaeróbias e aeróbias, e o segundo, de fungos e microrganismos aeróbios (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973; SUTTON, 2006; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

O caldo tioglicolato fornece ambiente aeróbico e anaeróbico no mesmo meio e, assim como a L-cisteína, é um antioxidante ou agente redutor que mantém a anaerobiose no tubo de cultura. A presença da resazurina, indicador de oxirredução, confere ao meio uma coloração rosada no topo da solução, não devendo ser maior que um terço da altura do frasco e, por conta da necessidade de distintas condições no mesmo meio, o comprimento e diâmetro do tubo são muito importantes. Esse meio é excelente para detecção de contaminação bacteriana, apresentando a vantagem de neutralizar preservativos

mercuriais, que podem causar bacteriostase (BUGNO, 2001; AKERS; LARRIMORE; GUAZZO, 2003; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010; UNITED STATES GOVERNMENT, 2012).

O segundo meio indicado para o teste de esterilidade, caseína de soja, apresenta um pH mais alto (7,5) que o tioglicolato (7,0) e é adequado para crescimento de fungos e leveduras, bactérias aeróbicas e psicrófilas, devido à sua temperatura de incubação. Este meio (caseína de soja) serviu como substituto do meio Sabouraud por proporcionar melhor crescimento para bactérias aeróbicas e permitir melhor recuperação de organismos aeróbicos de crescimento lento (BUGNO, 2001; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010). A adequação dos meios deve ser verificada a partir de controles positivos e negativos. O tamanho do inóculo utilizado nos controles positivos deve ser apropriado à sensibilidade exigida e, em se tratando de teste de esterilidade, são indicados inóculos de até 100 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (JIMENEZ, 2004d; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

2.1.4 Processo de amostragem e representatividade da amostra

A segurança do resultado do teste será maior quanto maior for o número de amostras ensaiadas. Porém, testar muitas amostras ocasiona problemas de ordem prática e econômica e, ainda assim, o procedimento de amostragem de produtos parenterais deve ser estatisticamente planejado para conferir ao produto a segurança e qualidade necessárias (BRYCE, 1956; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

A amostragem deve ser realizada a cada lote, sendo o conceito de lote definido como unidades preparadas nas mesmas condições e que têm entre si características homogêneas, inclusive em relação a risco de contaminação. É importante que se faça uma análise de risco do processo produtivo e que as amostras retiradas para teste representem as situações de pior caso; que em processos de enchimento asséptico sejam retiradas amostras nos momentos de parada, reinício e final de produção; e que em processos de esterilização terminal sejam retiradas unidades que em pontos críticos da câmara de

esterilização, identificados durante a validação da esterilização (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; BILL, 2010).

De acordo com a *United States Pharmacopeia* (2013) certo número de itens deve ser retirado de cada lote dependendo do tamanho do mesmo. O **QUADRO 1** representa o número de itens adequados à cada situação.

Quadro 1. Número de artigos a serem testados em relação ao número de artigos do lote de produto

Número de artigos do lote de produto	Número mínimo de unidades a serem testadas
Parenterais	
Não mais de 100 unidades	10% ou 4 unidades, o que for maior
Mais que 100, mas menos que 500 unidades	10 unidades
Mais de 500 unidades	2% ou 20 unidades, o que for maior
Parenterais de grande volume	2% ou 10 unidades, o que for menor
Oftálmicos e não injetáveis	
Não mais de 200 unidades	5% ou 2 unidades, o que for maior
Mais de 200 unidades	10 unidades
Antibióticos sólidos	
Unidades contendo menos de 5g	20 unidades
Unidades contendo mais de 5g	6 unidades
<i>Catgut</i> e outras suturas de uso veterinário	2% ou 5 unidades, o que for maior (máximo de 20 unidades)
Não mais de 100 unidades	10% ou 4 unidades, o que for maior
Mais de 100, mas não mais de 500 unidades	10 unidades
Mais de 500 unidades	2% ou 20 unidades, o que for menor
Produtos sólidos a granel	
Mais de 04 recipientes	Cada recipiente
Mais de 04, mas não mais de 50 recipientes	20% ou 4 recipientes, o que for maior
Mais de 50 recipientes	2% ou 10 recipientes, o que for maior

Fonte: UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013.

Nenhum plano de amostragem empregado pode assegurar que todas as unidades não testadas estejam de fato estéreis, limitação oriunda da natureza destrutiva do teste de esterilidade (BROWN, GILBERT, 1977; TIRUMALAI, 2005).

A **TABELA 1** mostra o cálculo das probabilidades de falha no teste de esterilidade em função do percentual de unidades contaminadas do lote de produto.

Tabela 1. Probabilidade de detecção de amostras contaminadas em relação ao percentual de unidades contaminadas

Percentual de unidades contaminadas do lote de produto	Probabilidade de detecção de amostras contaminadas
0,1	0.0198-2%
0,5	0.0952-9,5%
1	0.1813-18%
5	0.6321-63,2%
10	0.8647-86,5%
50	1.0000-100%
Tamanho do lote: 1.000 unidades; Unidades testadas: 20	

Fonte: BROWN, GILBERT, 1977.

A tabela acima demonstra a capacidade do teste em detectar altos níveis de contaminação com o plano amostral sugerido pelas farmacopeias (20 unidades testadas). Sendo assim, se houver 0,1% de unidades contaminadas no lote, a probabilidade deste lote ser aprovado é de 98%, mas, com a elevação a 10% de unidades contaminadas no mesmo lote, a probabilidade de rejeição é de 86% (BROWN, GILBERT, 1977; BUGNO, 2001; MOLDENHAUER, SUTTON, 2004; SCHROEDER, 2005; TIRUMALAI, 2005).

Estudos mostram que o aumento do número de amostras não aumenta a prevalência estatística na detecção de falhas de esterilidade, que deve ser assegurada durante o processo de fabricação pelas Boas Práticas de

Fabricação (BPF) e, em particular, pela validação de processos esterilizantes (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010; BUGNO, 2001).

2.1.5 Condições para realização do teste de esterilidade

É importante que a área destinada ao teste de esterilidade tenha condições no mínimo equivalentes às área de produção: a qualidade do ambiente é essencial para que não haja erros na obtenção de resultados como falsos positivos. O local de manipulação adequado ao teste deve se caracterizar como sala biolimpa (BUGNO, 2001; BILL, 2010; UNITED STATES GOVERNMENT, 2012; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013); convencionalmente, essas salas são áreas nas quais é insuflado ar filtrado através de Filtros de Alta Eficiência (HEPA), possibilitando controle da quantidade de partículas no ar contido na sala. Este controle é essencial, pois as partículas servem de suporte para o transporte e proteção de microrganismos, daí a importância do seu monitoramento periódico. A **TABELA 2** demonstra os limites máximos de concentração de partículas de ar por metro cúbico em ambientes controlados (UNITED STATES GENERAL SERVICES ADMINISTRATION, 1992; HALLS, 2002; COSSLET, 2007).

Tabela 2. Classificação ISO de ambientes controlados

Número de classificação ISSO	Limites máximos de concentração (partículas/m ³ de ar) para partículas iguais ou maiores que os tamanhos considerados					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
ISO Classe 1	10	2				
ISO Classe 2	100	24	10	4		
ISO Classe 3	1.000	237	102	35	8	
ISO Classe 4	10.000	2.370	1.020	352	83	
ISO Classe 5	100.000	23.700	10.200	3.520	832	29
ISO Classe 6	1.000.000	237.000	102.000	35.200	8.320	293
ISO Classe 7				352.000	83.200	2.930
ISO Classe 8				3.520.000	832.000	29.300

ISO Classe 9	35.200.000	8.320.000	293.000
--------------	------------	-----------	---------

Fonte: FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010.

A contagem de partículas totais oferece informação quantitativa e imediata sobre a qualidade do ar, o que representa vantagem sobre os métodos microbiológicos que necessitam de pré-incubação para a liberação de resultados (AVALLONE, 1985).

Embora a classificação *International Standard Organization* (ISO) seja importante e exigida das empresas no âmbito regulatório, ela não fornece informação sobre a qualidade microbiológica do ambiente, fazendo-se necessário o monitoramento deste. Tal monitoramento pode ser realizado por dois métodos, o passivo e o ativo (HALLS, 2002; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; COSSLET, 2007, EUROPEAN COMISSION, 2008; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010); o primeiro tipo de monitoramento (passivo) consiste na exposição de placas de Petri contendo meio de cultura em ambientes controlados por período de tempo definido. Partículas do ar contendo microrganismos se depositam por sedimentação nas placas e estas são incubadas por determinado período, após o qual são contadas e seus resultados avaliados. Esse método pode ser considerado como qualitativo ou semi-quantitativo, pois seus resultados podem ser afetados por correntes de ar e, além disto, o método não detecta a presença de microrganismos em suspensão que não se depositaram sobre a placa (AVALLONE, 1985; CLOSSET, 2007; CLONTZ, 2008; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010).

As placas devem ser posicionadas em locais onde ocorrem operações críticas e dentro das cabines de fluxo laminar, para simular as condições nas quais o produto é exposto. O ressecamento das placas durante o tempo de exposição e incubação deve ser avaliado para que a promoção de crescimento dos organismos encontrados não seja prejudicada (HALLS, 2002; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; ANDON, 2006; COSSLET, 2007; BILL, 2010; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

A técnica de amostragem ativa de ar consiste em impactar um volume de ar em placas de Petri ou outro tipo de suporte apropriado e, em seguida, incubá-las em temperatura e tempo apropriados para que haja o crescimento dos microrganismos coletados, permitindo a análise quantitativa dos dados gerados. Esta técnica permite detectar microrganismos em áreas com contagens baixas, o que não é possível através de amostragem passiva (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; ANDON, 2006; COSSLET, 2007; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

O monitoramento de superfícies é realizado principalmente pela técnica de contato de placas de RODAC[®]. Estas são similares às placas de Petri, com tamanho reduzido, contendo meio de cultura sólido em altura superior às suas bordas para que o seu contato seja maximizado. Após o contato com as superfícies, as placas são incubadas em temperaturas de 30-35 °C para detecção de bactérias e 20-25 °C para fungos e leveduras. Os meios de cultura comumente utilizados são ágar caseína de soja e ágar sabouraud dextrose, sendo o tempo de incubação de 5 dias para bactérias e 7 dias para fungos e leveduras. Após a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), são feitas avaliações sobre a qualidade do ambiente (BILL, 2010; COSSLET, 2007; CLONTZ, 2008; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010).

Pessoas consistem na maior fonte de contaminação em ambientes controlados, pois as partículas geradas pela descamação natural da pele contêm microrganismos e, portanto várias são as estratégias utilizadas para minimizar o risco de falha nos testes em decorrência do operador. Aqueles que trabalham em salas biolimpas devem ter um bom nível de higiene, fazer exames médicos periodicamente para atestar boa saúde, receber treinamento apropriado e ter nível de educação condizente com a função que exercem no processo (HALLS, 2002; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010). Ainda, a vestimenta utilizada por operadores deve ser adequada, seu material não deve liberar partículas no ambiente e seu *design* deve possibilitar a correta paramentação e conforto aos seus usuários (HALLS, 2004).

A United States Pharmacopeia 2013 recomenda limites máximos de aceitação para a análise quantitativa de resultados de contaminantes microbianos no ar, superfícies e nas luvas utilizadas pelos operadores, nas diferentes classes de áreas de acordo com a **TABELA 3**.

Tabela 3. Limites máximos de contaminação microbiana

Número de classificação ISO	Amostra de ar UFC/m ³	Placas de Petri (90 mm de diâmetro) UFC/placa	Placas RODAC® (55 mm de diâmetro) UFC/placa	Análise de Luvas (5 dedos) UFC/luva
ISO Classe 5	<1	<1	<1	<1
ISO Classe 6	<3	<3	<3	<3
ISO Classe 7	<5	<5	<5	<5
ISO Classe 8	<10	<10	<10	<10

Fonte: UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013.

O programa de monitoramento ambiental é capaz de demonstrar se a sala biolimpa está operando em condições adequadas para a realização do teste de esterilidade. O histórico de dados gerados pelo monitoramento deve ser submetido à análise de tendência, pois, devido à dificuldade de recuperação de microrganismos em ambientes com baixos níveis de contaminação, nem sempre é possível avaliar os resultados com base nos limites estabelecidos.

O aumento seguido de contagens microbianas (mesmo dentro do limite) pode ser indicativo de falha no sistema e deve ser seguido de investigações adicionais. É recomendado que parte dos microrganismos obtida na amostragem seja identificada, principalmente as colônias de maior incidência nas placas. O conhecimento qualitativo sobre o monitoramento ajuda a elucidar as fontes de contaminação do teste de esterilidade (EUROPEAN COMMISSION, 2001;

HALLS, 2002; JIMENEZ, 2004b; COSSLET, 2007; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2008).

2.1.6 Interpretação de resultados

O resultado do teste de esterilidade, desde a época de sua oficialização, foi fundamentado em observação macroscópica do crescimento microbiano, manifestado sob a forma de turvação do meio líquido ou aparecimento de colônias no meio sólido (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

Quando há evidência de turvação nos frascos contendo amostras, faz-se necessária uma cuidadosa investigação. A integridade dos frascos é examinada quanto à rachaduras, e a suspensão é submetida a tipos diferentes de luzes e à análise microscópica, para que a origem da suspensão seja elucidada (BILL, 2010; SUTTON, 2010).

Os compêndios oficiais recomendam a retirada de alíquotas da amostra suspeita e posterior incubação em meios líquido e sólido, em condições aeróbica e anaeróbica. Ainda, a revisão de registros do teste, incluindo o monitoramento ambiental, dados do processo de esterilização de materiais utilizados e do procedimento analítico, análise do controle negativo do meio de cultura e, se forem encontradas falhas nos registros ou procedimentos, o teste de esterilidade é considerado inválido (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973; AKERS, LARRIMORE, GUAZZO, 2003; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

A amostra deve ser submetida a testes bioquímicos e, se necessário, ensaios mais sensíveis, como métodos moleculares. Após a identificação do microrganismo, a falha pode ser atribuída aos procedimentos, materiais ou ambiente inadequados. O histórico do monitoramento ambiental da sala (ar, superfícies e pessoal) é uma ferramenta importante para que seja elucidada a fonte da contaminação, e a identidade do organismo deve ser esclarecida a fim

de demonstrar se os isolados da amostra e ambiente são idênticos, para confirmar a falha no teste (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973; AKERS, AGALLOCO, 1997; BILL, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Quando o teste é considerado inválido devido à falha no processo, deve ser efetuado o reteste com o mesmo número de unidades do teste anterior e, se não for observado crescimento, o produto é considerado aprovado. Contudo, se houver crescimento microbiano, então o produto não cumpre o requisito de esterilidade e é reprovado (UNITED STATES GENERAL SERVICES ADMINISTRATION, 1992; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

2.1.7 Liberação paramétrica

Devido às suas características intrínsecas e limitações, o teste de esterilidade não é capaz de garantir a esterilidade de produtos, sendo necessários cuidados e informações adicionais para preservar a segurança do paciente. Nesse contexto, são imprescindíveis os dados sobre o processo de esterilização, monitoramento ambiental e biocarga inicial dos produtos. Adicionalmente, os estudos de validação do processo de esterilização devem assegurar que o mesmo é capaz de inativar microrganismos nas formas vegetativas, bem como formas mais resistentes (esporos).

O conceito de liberação paramétrica é definido como a liberação de lotes com base em dados do processo de fabricação, sem a necessidade de testes nos produtos terminados. A qualidade do produto deve ser construída durante o processo de fabricação, e todas as suas etapas críticas devem ser submetidas à análise de risco, sendo necessária a ênfase aos controles de processo, que são estudados e avaliados, uma vez que seus resultados servem de base à documentação que suporta a liberação do lote.

A complexidade dos estudos de validação, necessários para a liberação do lote, torna esta metodologia de difícil alcance à maioria dos produtores.

Apesar de apresentar vantagens, o processo de liberação paramétrica não pode ser aplicado à todos os tipos produtos, como, por exemplo, medicamentos biotecnológicos. Para produtos que não sofrem esterilização terminal, o teste de esterilidade continua sendo necessário para garantir a qualidade (BARRICHELO, 1997; BUGNO, 2001; HABERER, 2004; PHARMACEUTICAL INSPECTION CONVENTION, 2007; EUROPEAN COMISSION, 2008; HOCK, CONSTANCE, WAH, 2012).

Pode-se, adicionalmente, considerar que conceitos atuais vinculados à Tecnologia Analítica em Processo (PAT) para produtos estéreis, altamente dependentes de validação criteriosa e regulamentação a fim de possibilitar a liberação paramétrica, podem alternativamente ser atingidos pelo emprego de métodos microbiológicos rápidos (HOCK, CONSTANCE, WAH, 2012).

2.2 Métodos microbiológicos rápidos

Os chamados métodos microbiológicos clássicos, constantes nos compêndios oficiais, são baseados em técnicas de cultivo em meios de cultura, coloração de Gram, análise de amostras em microscópio, diluição e plaqueamento de amostras de água, medicamentos e filtração, dentre outros. Estas técnicas são utilizados desde a oficialização dos ensaios e têm provido segurança e eficácia às análises microbiológicas, além de possuírem simplicidade operacional e baixo custo (SHINTANI, SAKUDO, MCDONNEL, 2011).

Devido à sua confiabilidade, há certa resistência, por parte das indústrias e autoridades regulatórias, para a implantação de novos métodos. Dentre os motivos para a cautela na inserção de novos métodos na área farmacêutica, métodos; o alto custo para implantação de algumas tecnologias; e a falta de recursos para a pesquisa e validação (FITZGERALD, 2003; JIMENEZ, 2004(c); (d); (e)).

Métodos rápidos podem ser mais sensíveis, precisos, diminuindo a manipulação da amostra, proporcionando miniaturização das análises e reduzindo o tempo de liberação do resultado do teste. São utilizados na área clínica e alimentícia com resultados satisfatórios, principalmente em relação à redução do tempo de resposta, o que possibilita o aumento da eficiência e produtividade, bem como redução de custos. Esta rapidez na liberação permite a obtenção de respostas em tempo real, o que possibilita uma liberação de produtos de produtos mais rápida, dinamizando todo o processo de produção (GREEN, RANDELL, 2004; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2008; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

Deve-se ter em mente que garantir a segurança do paciente é o principal objetivo dos fabricantes de novas tecnologias e, no caso de falhas, a empresa e os consumidores sofrem as consequências. Devido às características de certas enfermidades, pode ser criada uma grande demanda para a rápida fabricação e liberação de produtos, situação particularmente grave no caso de epidemias (NEWBY, JOHNSON, 2003; PARVEEN *et al.*, 2011).

A qualidade dos produtos deve ser assegurada pelas Boas Práticas de Fabricação: para garantir a qualidade e segurança, é vital que haja um processo totalmente validado e efetivamente controlado, sendo que este pode ser demonstrado pelo monitoramento microbiológico do processo, produto e operadores. Resultados em tempo real iriam auxiliar significativamente a melhoria do controle em processo, permitindo ações corretivas mais rápidas e efetivas. Esses fatores permitem diminuir a rejeição de lotes, perda de produção e otimização da análise de risco, mantendo baixos os custos do processo. Em outras situações, alguns dos atributos dos novos métodos poderão se constituir em itens de incremento de segurança ao paciente, menos onerosos (NEWBY, JOHNSON, 2003; JIMENEZ, 2004(a), (c), (e), (f); GRESSETT, VANHAECKE, MOLDENHAUER, 2008).

A transferência de novas tecnologias analíticas da indústria alimentícia para o setor farmacêutico tem sido um processo lento. Inicialmente, pela falta

de sensibilidade de alguns métodos. As amostras inerentes aos setores clínico e alimentício têm qualidade microbiológica muito distinta das amostras do setor farmacêutico, fazendo-se necessária a adequação dos métodos para que os mesmos cumprissem seu novo propósito. A falta de experiência dos fornecedores sobre os requisitos regulatórios específicos da indústria farmacêutica criou uma grande expectativa acerca dos novos métodos, porém tal expectativa não foi atendida. Esses fatores contribuíram com certo ceticismo, explicando, em parte, a cautela na introdução de novos métodos de validação (JIMENEZ, 2004(d), (e); NEWBY, JOHNSON, 2003, NEWBY, 2005).

Algumas das preocupações das autoridades regulatórias referem-se à validação dos novos métodos, os quais também devem ser comprovados eficientemente equivalentes aos métodos clássicos. A variabilidade inerente aos ensaios microbiológicos se constitui em desafio ao lidar com a equivalência entre as tecnologias. Adicionalmente, alguns dos métodos de referência, como a técnica por filtração em membrana e plaqueamento em ágar, possuem sensibilidade inferior às novas tecnologias e, como resultado, a comparação direta entre eles resulta em baixa correlação (NEWBY, JOHNSON, 2003; JIMENEZ, 2004(a); KORCZYNSKI, 2005).

2.2.1 Tipos de métodos microbiológicos rápidos

Algumas tecnologias se encontram bem desenvolvidas, enquanto outras se encontram em estágio inicial de desenvolvimento. Nem todas estão disponíveis comercialmente, sendo que algumas delas são mais adequadas a instituições de pesquisa, devido sua complexidade e falta de robustez exigida para a aplicação em rotina farmacêutica (GREEN, RANDELL, 2004; SUTTON, 2005).

Métodos alternativos empregam técnicas diretas e indiretas de detecção. Os métodos que fazem uso da primeira técnica detectam diretamente os microrganismos, enquanto os métodos indiretos detectam sinais do metabolismo microbiano ou seus componentes, sendo que em alguns casos o

sinal pode ser amplificado através de técnicas de enriquecimento. Os métodos podem ser classificados em categorias de acordo com sua função ou tecnologia (DAANE, 2005; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; SANDLE, 2012; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013). Segundo Green e Randell (2004), Gressett, Vanhaecke e Moldenhauer (2008) e a *Parenteral Drug Association* (2013), para fins de classificação os métodos rápidos podem ser subdivididos em três categorias:

1. **Técnicas qualitativas**, que detectam a presença ou ausência de microrganismos na amostra, podem necessitar de uma etapa de pré-incubação para aumentar sua sensibilidade e geralmente oferecem uma análise semi-quantitativa da amostra. As técnicas de bioluminescência de ATP, medida de consumo/produção de gás e micro calorimetria são exemplos de métodos qualitativos.
2. **Técnicas quantitativas**, que enumeram os microrganismos presentes na amostra, determinam se o limite microbiano recomendado para a amostra foi excedido. Exemplos desta técnica são a citometria de fase sólida, a citometria de fluxo e a microscopia direta de filtro epifluorescente.
3. **Técnicas de identificação e caracterização de microrganismos** avaliam as características fenotípicas e genotípicas dos organismos presentes na amostra. São exemplos: determinação de perfil de ácido graxo, amplificação de ácido desoxirribonucleico, sequenciamento de ácido desoxirribonucleico.

Outra possibilidade de classificação relativa aos métodos rápidos considera a tecnologia na qual tais métodos se baseiam (PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013). Assim, tem-se:

- **Métodos baseados em crescimento:** têm por base medidas de parâmetros bioquímicos ou fisiológicos, que refletem o crescimento de microrganismos e, sendo dependentes deste crescimento, não caracterizam aplicação em testes realmente rápidos. Adicionalmente, a

seletividade inerente de meios de cultura e suas condições de incubação limitam a faixa de microrganismos a serem enumerados. A sua maior vantagem reside na capacidade de processamento de várias amostras simultaneamente e potencial obtenção de resultados em menor tempo.

- **Métodos baseados em viabilidade celular:** baseiam-se na coloração vital de componentes bioquímicos das células microbianas, ou fluorescência da clivagem enzimática de substratos fluorogênicos das paredes funcionais. Como não se baseiam em crescimento dos microrganismos, podem ser universais e rápidos.

- **Métodos baseados em componentes celulares ou artefatos:** envolvem a análise de componentes originários de células microbianas para fins de identificação. Podem conduzir a resultados rápidos, mas necessitam de grandes bases de dados e elevado número de células, em algumas situações. São exemplos deste método: análise de ácidos graxos utilizando cromatografia a gás, ELISA, espectrometria de massas dos componentes celulares (MALDI-TOF).

- **Métodos baseados em ácidos nucleicos:** compreende a amplificação de DNA microbiano utilizando a reação de polimerase em cadeia (PCR) e técnicas de riboprinting. Estes métodos têm como objetivo a identificação microbiana e distinção de cepas.

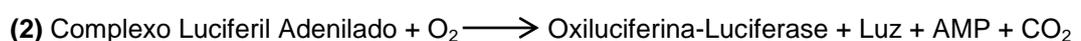
A variedade de aplicações dos métodos rápidos é extensa, mas as mais comumente empregadas na indústria farmacêutica são: monitoramento ambiental; ensaios-limite para quantificação de microrganismos em produtos não estéreis; teste de esterilidade; análise de qualidade de água de produto e processo; validação de limpeza; testes para detecção de microrganismos específicos (patógenos); identificação de microrganismos; análise da qualidade de matérias primas e eficácia de conservantes (KORCZYNSKI, 2005; SHINTANI, 2013).

Para escolha dos métodos a serem adotados, é importante que se tenha total entendimento sobre a tecnologia a ser adotada, o que implica um estudo preliminar à validação (PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013).

2.2.2 Técnica de bioluminescência de ATP aplicada ao teste de esterilidade

A Adenosina Trifosfato (ATP) é a molécula que representa a maior fonte de energia para todas as células vivas, incluindo microrganismos. A molécula de ATP é formada por um grupo ribose, adicionado de adenina e três grupos fosfato. A hidrólise destes grupos fosfato libera energia e aciona uma série de reações biológicas intracelulares. O ATP é essencial para viabilidade e crescimento de microrganismos e pode ser usado como um marcador de contaminação (JIMENEZ, 2004(e); CLONTZ, 2008; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013; SANDLE, 2012).

A bioluminescência pode ser definida como um sistema biológico de alta eficiência, resultado de reações quimioluminescentes. Ela ocorre naturalmente no vagalume *Photinus pyralis* e foi descrita pela primeira vez por McElroy em 1947, funcionando da seguinte forma: na presença do substrato D-luciferina, oxigênio e íons de magnésio, a enzima luciferase utiliza a energia em forma de ATP para oxidar a D-luciferina e produzir luz (JIMENEZ, 2007; LACH, 2005; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010). As reações **(1)** e **(2)** descrevem o processo:



Segundo este sistema, em condições experimentais o ATP liberado pelos microrganismos reage com a luciferina e produz luz amarelo esverdeada. Esta reação é específica e apresenta alta eficiência: só pode ser iniciada pelo ATP e aproximadamente um fóton é gerado a cada molécula consumida. No entanto, apesar da linearidade da reação, a luz gerada não é visível a olho nu (BUSSEY, TSUJI, 1986; JIMENEZ, 2004(c), (f); DAANE, 2005).

A medida da luz gerada no ensaio é efetuada através de um luminômetro, dispositivo que detecta a luz e a converte em um sinal eletrônico traduzido em Unidades Relativas de Luz (URL) (JIMENEZ, 2004(f); DAANE, 2005; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

Apesar da linearidade da reação entre o ATP e o sistema enzimático luciferina/luciferase, os valores de URL não são correlacionados aos valores de Unidades Formadoras da Colônia (UFC). A quantidade de ATP intracelular depende de diversos fatores como o tamanho do microrganismo, espécie, idade e condições ambientais e nutricionais em que o organismo se encontra. Células de leveduras e fungos podem conter 100 vezes mais ATP que os organismos Gram-negativos típicos, enquanto esporos possuem quantidades quase insignificantes de ATP. Devido a essas características, o ensaio de bioluminescência é considerado semi-quantitativo ou qualitativo, dependendo da tecnologia utilizada (JIMENEZ, 2004(a); CLONTZ, 2008; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

Nos sistemas comercialmente disponíveis, o ensaio ocorre da seguinte forma: primeiro é necessária a depleção do ATP exógeno de fontes não microbianas, seguida pela lise celular para liberação do ATP, pela adição dos reagentes enzimáticos em presença de oxigênio e magnésio e, enfim, pela leitura da luz resultante da reação. A intensidade de luz emitida no teste é proporcional à quantidade de ATP na amostra (NEWBY, JOHNSON, 2003; JIMENEZ, 2004(a); LACH, 2005; CLONTZ, 2008; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

O resultado expresso em URL é considerado positivo se exceder em duas a três vezes o valor do controle negativo do meio de cultura. Se o resultado estiver abaixo deste valor, o controle do meio de cultura é classificado como negativo, o que significa que a amostra foi aprovada no teste de esterilidade. Caso contrário, se o valor de URL das amostras exceder em três vezes o valor do controle negativo, alíquotas da amostra devem ser retiradas para posterior identificação do microrganismo encontrado (UNITED STATES GENERAL SERVICES ADMINISTRATION, 1992; NEWBY, JOHNSON, 2003; SUTTON, 2006; CLONTZ, 2008).

Se aplicado à amostras de alta biocarga, o tempo de ensaio é curto (aproximadamente uma hora), mas, em amostras de biocarga baixa ou próximas a zero, é necessária uma etapa de pré-incubação que pode durar entre 6 e 48 horas. Os níveis de contaminação na amostra devem estar em torno de 10^3 a 10^4 UFC por mL para que seja detectado o sinal do equipamento (JIMENEZ, 2004(c), (f); CLONTZ, 2008; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008).

A sensibilidade do ensaio está sujeita a diversos fatores, como a composição do meio de cultura, sensibilidade do equipamento e nível de ATP nos microrganismos a serem analisados. A literatura relata um limite de detecção em torno de 10^4 UFC por mL de amostra: teoricamente, se houver uma célula metabolicamente ativa na amostra a mesma irá se replicar e tornar possível sua detecção. Comparando-se ao limite em torno de 10^7 inerente ao teste de esterilidade convencional, trata-se de um avanço em termos de tempo e sensibilidade. Produtos que provocam turvação no meio de cultura e que, portanto, tornam a interpretação de resultados difícil, podem ser analisados empregando essa tecnologia (BUSSEY, TSUJI, 1986; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; LA DUC *et al.*, 2007).

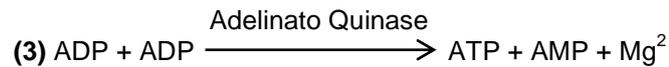
O produto e os meios de cultura candidatos à utilização no ensaio devem ser considerados na validação do método apresentado neste trabalho, pois alguns produtos contêm altos níveis de ATP extracelular, o que pode interferir no resultado do ensaio, e o mesmo pode ocorrer com os meios de

cultura. Por essa razão, o desenvolvimento de meios específicos que potencializem a detecção têm sido motivo de pesquisa, uma vez que produtos de origem animal ou biotecnológica podem não ser adequados à análise através da tecnologia apresentada, pois a reação que gera bioluminescência é de natureza enzimática e, portanto, sujeita a interferências que podem inibir ou diminuir a atividade enzimática, afetada, ainda, pela presença de nucleotídeos de fosfato. Pode ser realizado um pré-tratamento na amostra para que a interferência dos produtos no ensaio seja diminuída, e o desenvolvimento de enzimas em combinação com a adenosina fosfato deaminase e apirase, que reduzem o ATP extracelular, possibilitam a análise de uma faixa mais ampla de produtos (JIMENEZ, 2004(e); CERESA, BALL, 2005; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

Algumas precauções devem ser tomadas no procedimento: o processo de esterilização por autoclavação não elimina o ATP, fato importante ao se considerar que materiais como ponteiras, pipetas e filtros devem ser livres de ATP. O uso de luvas estéreis sem pó é indicado para diminuir a possibilidade de contaminação, e o procedimento de manipulação de amostras deve seguir a técnica asséptica (JIMENEZ, 2004(f); LACH, 2005).

O método rápido de bioluminescência de ATP tem sido adotado na indústria de alimentos e cosméticos. Entretanto, para atender ao quesito da sensibilidade e outros parâmetros de validação específicos para a indústria farmacêutica, apenas atualmente se observa a evolução dos sistemas. Existem disponíveis no mercado dois tipos de sistemas, um enumera micro colônias que crescem em placas e o outro indica a ausência/presença de microrganismos, aplicável ao teste de esterilidade (GREEN, RANDELL, 2004; NEWBY, JONHSON, 2003).

O desenvolvimento do sistema de amplificação de ATP foi uma evolução significativa na tecnologia. A Adenilato Quinase é uma enzima intracelular que tem a função de equilibrar as concentrações de nucleotídeos de adenina; a reação **(3)** demonstra a amplificação do ATP.



A introdução de um reagente a base de ADP consiste um recurso para amplificar a formação de ATP durante o ensaio. A Adenilato Quinase pode gerar ATP a partir de ADP e fosfato, na presença de alguma fonte de energia. São necessárias quantidades mínimas de ATP para que seja obtida resposta e a Adenilato Quinase extraída das células irá continuar produzindo ATP enquanto houver substrato suficiente. Esta estratégia tornou a técnica de bioluminescência de ATP mais rápida e sensível e, conseqüentemente, mais adequada às necessidades do setor farmacêutico (MARINO, MAIER, CUNDELL, 2000; JIMENEZ, 2004(a),(c); LACH, 2005; CLONTZ, 2008).

Protocolos para medicamentos não estéreis de várias formas (dentre elas comprimidos, cápsulas, líquidos e suspensões) já foram executados com êxito, o que demonstra a compatibilidade do sistema com produtos farmacêuticos. Outras aplicações do método rápido são: monitoramento ambiental, controle de qualidade de água para produto e processo, validação de limpeza, teste de esterilidade e avaliação de eficácia de conservantes. O desafio mais crítico, neste momento, é sua aplicação no teste de esterilidade (JIMENEZ, 2004(a), (e), (f); CLONTZ, 2008; LACH, 2005)

Mediante este desafio, as vantagens do método abordado – dentre as quais estão robustez, confiabilidade, sensibilidade, redução da manipulação das amostras, miniaturização e automação dos ensaios e redução de tempo para liberação de resultados – apontam para a efetivação de sua implementação, uma vez que consiste um sistema que utiliza reações bioquímicas e instrumentação ao invés da dependência na avaliação de operadores que pode ser subjetiva ou falha (JIMENEZ, 2004(e),(f); CLONTZ, 2008; PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013).

2.3 Validação de métodos microbiológicos rápidos qualitativos

A validação de métodos microbiológicos rápidos qualitativos é essencial para demonstrar que os mesmos são adequados ao seu propósito, provendo resultados com segurança, precisão e reprodutibilidade. Ao iniciar um trabalho de validação de métodos rápidos, deve-se considerar a inerente variabilidade dos métodos microbiológicos (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2008; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010; SANDLE, 2012).

A validação de métodos microbiológicos rápidos qualitativos deve ser precedida da qualificação do equipamento. Quando este estiver acoplado a um sistema informatizado, hardware e software também devem ser qualificados de acordo com os requisitos a seguir (MOLDENHAUER, 2005; NEWBY, 2005; SUTTON, 2006; PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013):

- **Qualificação de *design*:** provê evidência documentada de que o *design* do equipamento é adequado para o desempenho do método.
- **Qualificação de instalação:** verificação e documentação de que o equipamento foi instalado de acordo com as especificações. Inclui inspeção visual do equipamento, manuais de operação e verificação de que as utilidades requeridas (água, eletricidade) estão instaladas corretamente.
- **Qualificação de operação:** confirmação de que o equipamento foi instalado e funciona de acordo com os limites pré-determinados, quando operado segundo os procedimentos operacionais padrão.
- **Qualificação de desempenho:** fornece evidência documentada de que o equipamento foi instalado e opera de acordo com os procedimentos padrão, funcionando consistentemente de acordo com os critérios pré-determinados e, portanto conduz a resultados corretos. O equipamento é submetido a testes-desafio e deve cumprir os critérios de validação.

O *Parenteral Drug Association (PDA) Technical Report 33* define os critérios de validação aplicáveis aos métodos microbiológicos rápidos a partir de sua classificação como qualitativo ou quantitativo, de acordo com as características do método a ser validado, conforme expresso no **QUADRO 2**.

Quadro 2. Parâmetros de validação exigidos de acordo com as características do método analítico

Critério	Método Qualitativo	Método Quantitativo
Exatidão	Não	Sim
Precisão	Não	Sim
Especificidade	Sim	Sim
Limite de detecção	Sim	Sim
Linearidade	Não	Sim
Faixa de operação	Não	Sim
Robustez/Repetibilidade	Sim	Sim
Equivalência	Sim	Sim

Fonte: PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013.

Os métodos qualitativos, devido às suas características, devem cumprir os requisitos de validação indicados abaixo, bem como a forma de determinação ao cumprimento ou não de tais requisitos.

- **Especificidade:** capacidade de detectar uma ampla faixa de microrganismos demonstrando a adequação do método ao que é proposto. **Determinação:** desafiar o método com uma ampla faixa de microrganismos apropriada à técnica. Testar o método com uma ampla gama de amostras.

- **Limite de detecção:** indica o menor número de microrganismos que o método é capaz de detectar sob condições experimentais. **Determinação:** os dois métodos (tradicional e alternativo) devem ser avaliados com amostras de baixo nível de contaminação (menor que 5 UFC por amostra). Os resultados da recuperação dos dois métodos devem ser avaliados.

- **Robustez:** capacidade do teste de se manter estável, mesmo com pequenas mudanças nas condições operacionais (como mudança de analistas, instrumentos, lotes de reagentes e laboratório). Pode ser definida como a resistência intrínseca à influências exercidas por variáveis operacionais e ambientais nos resultados providos pelo método. **Determinação:** este é um parâmetro avaliado pelo fornecedor do método.

- **Equivalência:** medida que demonstra o quão similares são os resultados entre os métodos. **Determinação:** as análises dos métodos devem ser realizadas em paralelo, utilizando culturas puras. A variabilidade das amostras é um fator limitante na avaliação dos resultados. Um número apropriado de réplicas deve ser testado para que seja possível avaliar a variabilidade da amostra. A equivalência deve ser demonstrada estatisticamente através do método mais adequado à tecnologia de escolha.

Muitos métodos rápidos são executados em combinação com os métodos tradicionais. Por exemplo, o teste de esterilidade por filtração de membrana pode ser realizado de acordo com a farmacopeia adotada até a etapa de incubação, momento após o qual pode ser analisado de acordo com o método rápido de escolha. O objetivo principal do teste de esterilidade é detectar contaminação microbiana do produto no menor tempo possível e, sendo assim, seu atributo quantitativo não se constitui em parâmetro obrigatório em uma avaliação inicial. Por conseguinte, métodos qualitativos de alta sensibilidade são preferíveis à métodos quantitativos (UNITED STATES

GENERAL SERVICES ADMINISTRATION, 1992; MOLDENHAUER, 2005; SUTTON, 2006; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013).

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Avaliar o desempenho dos métodos convencional e alternativo de esterilidade, quando estes são executados em paralelo, a partir do emprego da técnica de bioluminescência de Adenosina Trifosfato (ATP);
- Expor os estudos inerentes ao desenvolvimento e validação do método de bioluminescência aplicado a produtos parenterais de grande volume;
- Investigar a equivalência ou possível superioridade do método rápido por bioluminescência de ATP em relação ao método convencional de esterilidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Soluções parenterais de grande volume

Para este estudo, foram utilizados, na forma de bolsas de 100 mL, quatro tipos de soluções parenterais de grande volume: solução salina 0,9%; solução de metronidazol 0,5%; Ringer lactato; e solução de dextrose 5%. Trabalhou-se com três diferentes lotes de cada tipo de solução para a determinação de sensibilidade do método, somando um total de 320 bolsas. Na avaliação do limite de detecção, utilizou-se apenas solução fisiológica 0,9%, em um total de 240 bolsas, oriundas de quatro diferentes lotes.

4.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos testes foram Meio tioglicolato e Caldo caseína de soja, conforme a composição indicada nos **QUADROS 3 e 4**.

Quadro 3. Composição do meio tioglicolato

Componente	Massa
L-Cistina	0,5 g
Cloreto de sódio	2,5 g
Dextrose – C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O	5,5 g
Ágar granulado (umidade não maior que 15%)	0,75 g
Extrato de levedura (solúvel em água)	5,0 g
Digesto pancreático de caseína	15,0 g
Tioglicolato de sódio	0,5 g
Ácido tioglicólico	0,3 mL
Solução de resarzurina sódica (1:1000), recém preparada	1,0 mL
Água qsp	1.000 mL
pH após esterilização: 7,1 ± 0,2	

Quadro 4. Composição do Caldo caseína de soja

Componente	Massa
Digesto pancreático de caseína	17,0 g
Digesto papaínico de farinha de soja	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
Dextrose – C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O	2,5 g
Água qsp	1.000 mL
pH após esterilização: 7,3 ± 0,2	

4.3 Microrganismos de escolha

Neste estudo, foram utilizados microrganismos certificados na forma de *Bioballs*[®] *Singleshot*[™], contendo entre 28 e 33 Unidades Formadoras de Colônia (UFC), segundo o certificado de análise. Adicionalmente a estes, foram selecionados os microrganismos *Kocuria rosea* e *Micrococcus luteus*, encontrados com maior frequência no ambiente laboratorial. O **QUADRO 3** mostra os microrganismos de escolha e suas cepas correspondentes.

Quadro 5. Microrganismos selecionados para o ensaio

Microrganismo	Cepa da <i>Bioball</i> [®]	Cepa ATCC equivalente
<i>Bacillus subtilis</i>	NCTC 10400	6633
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3179	10231
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC 12924	9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 10788	6538
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	NCPF 2275	16404
<i>Clostridium sporogenes</i>	NCTC 12935	11437
Microrganismos isolados do ambiente		
<i>Kocuria rosea</i>		
<i>Micrococcus luteus</i>		

4.4 Validação do teste de esterilidade

Paralelamente, procedeu-se a estudos empregando o teste de esterilidade convencional (método indireto) e a bioluminescência de ATP (Celsis Advance™ Ampiscreen™) como método alternativo. Para tanto, como parâmetros de validação foram estudadas a sensibilidade, especificidade, robustez e o limite de detecção do método alternativo.

Foram realizados ensaios com os microrganismos propostos, adotando-se níveis de contaminação de 30, 10, 2 e 0,4 UFC, veiculados em 1 mL de solução salina. Os ensaios de determinação de sensibilidade foram realizados utilizando o nível de inóculo de 30 UFC e, nos ensaios de determinação de limite de detecção, foram utilizados os níveis de 10, 2 e 0,4 UFC.

Os inóculos foram preparados pela adição de unidades de *Bioballs*® contendo entre 28 e 33 UFC à solução salina. Após o preparo das suspensões microbianas, as mesmas foram diluídas até as concentrações de 30 UFC/mL, 10 UFC/mL, 2 UFC/mL e 0,4 UFC/mL. Os microrganismos de origem ambiental, após isolamento, foram padronizados até a concentração de 30 UFC/mL a partir do emprego de múltiplas diluições. Os seguintes controles necessários à validação foram incorporados ao estudo:

- **Controles negativos:** para obtenção dos controles negativos, procedeu-se à filtração dos produtos conforme técnica do teste de esterilidade convencional, com transferência da membrana ao meio de cultura, sem a adição de inóculo, seguido da incubação da amostra nas condições de teste.
- **Controle positivo qualitativo:** procedeu-se à adição de 1 mL de cada suspensão microbiana preparada à membrana filtrante, seguindo-se à filtração de 50 mL de solução salina estéril 0,9%. A membrana filtrante inoculada foi transferida aos meios de cultura adequados e estes foram incubados em temperatura apropriada, conforme o microrganismo em questão.

- **Controle positivo quantitativo das *Bioballs*[®]:** com o objetivo de confirmar os dados do certificado analítico fornecido pelo fabricante, no qual consta que cada *Bioball*[®] contém entre 28 e 33 UFC, com desvio padrão de no máximo 3 UFC, submeteu-se uma *Bioball*[®] de cada lote adquirido à contagem microbiana. Empregou-se, na enumeração, placas de *Petrifilm*[®], nas quais a *Bioball*[®] teste era colocada em posição central, seguindo-se da hidratação do conjunto com 100 µl de solução salina estéril. As placas foram incubadas de acordo com as condições exigidas por cada microrganismo e os resultados foram registrados.
- **Controle positivo quantitativo das soluções-teste:** a cada suspensão microbiana preparada, uma alíquota de 1 mL foi retirada para plaqueamento em meio de cultura sólido, com o objetivo de confirmar as contagens microbianas esperadas à cada diluição. Após incubação, os resultados das contagens foram registrados.

4.5 Teste de esterilidade convencional

As amostras do estudo foram submetidas ao teste de esterilidade convencional pelo método indireto. O teste foi realizado em cabine de segurança biológica utilizando técnicas assépticas.

Alíquotas de 100 mL de cada uma das amostras foram submetidas à filtração com membranas de 0,45 µm de diâmetro de poro. Procedeu-se, então, à lavagem da membrana com solução salina estéril a 0,9%, e a última solução de rinsagem foi contaminada com 1 mL de inóculo.

Após a filtração das soluções, as membranas foram removidas e, com auxílio de uma pinça estéril, as membranas foram retiradas e seccionadas em duas partes. Estas, por sua vez, foram transferidas para frascos contendo 20 mL de meio caldo caseína de soja ou meio tioglicolato, de acordo com a identidade do microrganismo. As condições de incubação dos frascos obedeceram às exigências específicas, conforme descrito no **QUADRO 6**. Os frascos

permaneceram incubados por 14 dias até a leitura com leituras diárias até o final do período.

Quadro 6. Condições de incubação das amostras

Microorganismo teste	Meio de cultura	Condições	Temperatura
<i>Clostridium sporogenes</i>	Meio tioglicolato	Anaeróbicas	30-35 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>		Aeróbicas	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Kocuria rosea</i>			
<i>Micrococcus luteus</i>			
<i>Bacillus subtilis</i>	Caldo caseína de soja		20-25 °C
<i>Candida albicans</i>			
<i>Aspergillus brasiliensis</i>			

4.5.1 Teste de esterilidade convencional com solução de metronidazol

Para evitar incompatibilidades entre a solução de metronidazol 0,5% (antimicrobiano de largo espectro) e os microrganismos, diminuindo sua recuperação e detecção, fez-se uso da membrana filtrante com poro tortuoso no teste de esterilidade convencional.

4.6 Teste de esterilidade pelo método alternativo

No início de cada dia de trabalho, o aparelho foi ligado e, a seguir, foram efetuados controles diários do equipamento, abrangendo controle positivo do ATP, controle negativo do equipamento e controle negativo dos reagentes. Alíquotas de 50 µl do meio de cultura resultantes do teste de esterilidade convencional foram retiradas após o período de incubação de 96 horas e submetidas à agitação de vortex por um período de 30 segundos, em seguida

analisadas pelo método alternativo Celsis Ampiscreen™, e depositadas em cubetas livres de ATP. Na câmara do equipamento foram dispostas as amostras na seguinte ordem: controlos positivos, controle negativo e duplicatas das amostras. Os dados gerados pelo equipamento foram analisados e comparados aos dados do teste de esterilidade convencional.

4.7 Amostragem aplicada aos parâmetros de validação

Nos testes de determinação de especificidade (níveis de inóculo de 30 UFC), foram empregando membranas contaminadas individualmente com os microrganismos *Aspergillus brasiliensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Micrococcus luteus* e *Kocuria rosea*. Para as quatro soluções parenterais (solução fisiológica 0,9%, metronidazol, Ringer lactato e solução de dextrose) foram usadas 10 bolsas de cada solução por microrganismo, totalizando 320 testes.

Nos testes de limite de detecção, estudou-se os microrganismos *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Clostridium sporogenes*. Nesta fase, foram analisados três níveis de inóculo, sendo 10 UFC (C1), 02 UFC (C2) e 0,4 UFC (C3); para cada nível foram realizados 16 testes, sendo 48 testes por microrganismo, em um total de 240 testes.

Alíquotas dos meios de cultura (meio tioglicolato e caldo caseína de soja), nos quais as membranas se encontravam incubadas, foram retiradas e analisadas pelo método alternativo.

O método alternativo foi avaliado em sua capacidade de cumprir os critérios de especificidade, limite de detecção e robustez, sendo que a especificidade foi avaliada pela capacidade do método em detectar a gama de microrganismos proposta; o limite de detecção proposto teve por base a

avaliação dos resultados das diferentes concentrações microbianas e a robustez foi avaliada a partir do estudo do impacto de diferentes lotes de meio de cultura, distintos analistas e distintos dias de teste.

A equivalência entre os métodos convencional e alternativo foi avaliada pelo modelo estatístico de teste de proporções, com vistas a investigar se os métodos são ou não diferentes estatisticamente.

4.8 Critérios para análise dos resultados

O método alternativo foi avaliado em sua capacidade de cumprir os critérios de especificidade, limite de detecção e robustez, sendo que a especificidade foi avaliada pela capacidade do método em detectar a gama de microrganismos proposta; o limite de detecção proposto teve por base a avaliação dos resultados das diferentes concentrações microbianas e a robustez foi avaliada a partir do estudo do impacto de diferentes lotes de meio de cultura, distintos analistas e distintos dias de teste.

A equivalência entre os métodos convencional e alternativo foi avaliada pelo modelo estatístico de teste de proporções, com vistas a investigar se os métodos são ou não diferentes estatisticamente.

5. RESULTADOS

5.1 Controle de qualidade das *Bioballs*[®]

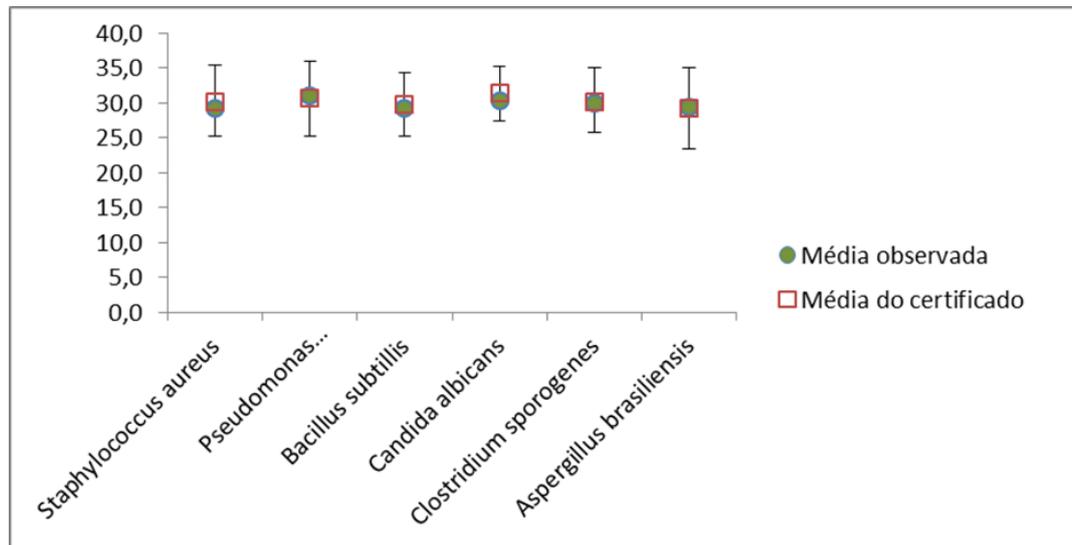
Tabela 4. Resultado do controle de qualidade das *Bioballs*[®] – lotes B1975, B2212, B2317, B1948, B2304 e B2133

Microrganismo	Lote	Contagens verificadas (UFC/ <i>Bioball</i> [®])				Média	Desvio Padrão
		29	33	30	25		
<i>Staphylococcus aureus</i>	B1975	29	33	30	25	29,3	3,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B2212	32	33	30	29	31,0	1,8
<i>Bacillus subtilis</i>	B2317	28	28	31	30	29,3	1,5
<i>Candida albicans</i>	B1948	30	32	29	30	30,3	1,3
<i>Clostridium sporogenes</i>	B2304	30	32	28	30	30,0	1,6
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	B2133	29	31	30	27	29,3	1,7

Tabela 5. Certificado de análise fornecido pelo fabricante correspondente às *Bioballs*[®] – lotes B1975, B2212, B2317, B1948, B2304 e B2133 – e comparação com as médias obtidas

Microrganismo	Lote	Médias Obtidas	Certificados de Análise			
			Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
<i>Staphylococcus aureus</i>	B1975	29,25	30,1	2,4	25,3	34,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B2212	31,00	31,7	2,7	25,3	36,0
<i>Bacillus subtilis</i>	B2317	29,25	29,7	2,2	25,2	34,3
<i>Candida albicans</i>	B1948	31,25	31,4	1,8	27,5	35,2
<i>Clostridium sporogenes</i>	B2304	30,00	30,2	2,4	25,3	35,0
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	B2133	29,25	29,2	2,9	23,4	35,1

Figura 1. Desvio encontrado entre as médias do certificado de análise e as médias observadas experimentalmente nas *Bioballs*[®] – lotes B1975, B2212, B2317, B1948, B2304 e B2133



5.2 Resultados do monitoramento ambiental da sala de trabalho

Quadro 7. Resultados do monitoramento ambiental pelo método de amostragem passiva de ar, por um período de dois meses, da sala onde foram realizados os teste de esterilidade

Meio de Cultura	Ponto 1 UFC/ placa	Ponto 2 UFC/ Placa	Ponto 3 UFC/ Placa	Ponto 4 UFC/ placa	Ponto 5 UFC/ placa	Ponto 6 UFC/ placa	Ponto 7 UFC/ Placa	Ponto 8 UFC/ Placa
TSA	1	1	1	1	1	1	1	2
DAS	1	0	0	0	1	0	0	1
TSA	0	0	1	0	0	1	0	1
DAS	0	0	0	0	1	0	0	1
TSA	1	1	1	1	0	1	1	1
DAS	1	0	0	0	1	1	0	1
TSA	1	1	1	1	0	0	0	0
DAS	1	0	0	0	0	1	0	1
TSA	1	1	0	1	1	0	1	1
DAS	1	0	0	0	0	1	0	1

Legenda: **Ponto 1:** antecâmara; **Ponto 2 :** sala de incubadoras; **Ponto 3:** sala de incubadoras; **Ponto 4:** sala de incubadoras (centro da sala); **Ponto 5:** sala de teste (lateral direita); **Ponto 6:** sala de testes (próximo à cabine); **Ponto 7:** sala de testes (centro da sala); **Ponto 8:** antecâmara (vestiário sujo); **TSA:** ágar triptona de soja; **DAS:** ágar sabouraud dextrose.

5.3 Avaliação de especificidade

Para determinação de especificidade do método analítico realizado com os microrganismos *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Kocuria rosea* e *Micrococcus luteus*, foram testados os produtos: solução fisiológica 0,9%; Ringer lactato; solução de dextrose 5%; e solução de metronidazol 0,5%. Nesta fase do estudo, utilizou-se concentrações de 30 UFC/mL de cada um desses produtos nas amostras, seguida de incubação por 96 horas até a leitura pelo método alternativo. Os resultados dos ensaios se mostraram positivos com todos os microrganismos e produtos testados.

5.4 Avaliação de limite de detecção

A avaliação do limite de detecção do método é demonstrado pelas **TABELAS 6** e **FIGURAS 2 a 6**, nas quais foram avaliados a quantidade de resultados positivos nos dois métodos, convencional e alternativo, nas diferentes concentrações de inóculo, ou seja, 10 UFC (C1), 2 UFC (C2) e 0,4 UFC (C3). Os produtos de escolha para os testes foram quatro lotes de solução fisiológica 0,9%.

Tabela 6. Número de resultados positivos e percentual de detecção das amostras contaminadas de solução fisiológica 0,9%

Níveis	Microrganismo	Resultados Positivos dos Métodos		Percentual de Positivos dos Métodos	
		Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
C1	<i>S. aureus</i>	16	16	100%	100%
C1	<i>C. sporogenes</i>	16	16	100%	100%
C1	<i>A. brasiliensis</i>	16	16	100%	100%
C1	<i>B. subtilis</i>	16	16	100%	100%
C1	<i>C. albicans</i>	16	16	100%	100%
C2	<i>S. aureus</i>	14	15	88%	94%
C2	<i>C. sporogenes</i>	11	11	69%	69%
C2	<i>A. brasiliensis</i>	07	11	44%	69%
C2	<i>B. subtilis</i>	09	10	53%	63%
C2	<i>C. albicans</i>	06	10	38%	63%
C3	<i>S. aureus</i>	02	02	13%	13%
C3	<i>C. sporogenes</i>	02	02	13%	13%
C3	<i>A. brasiliensis</i>	00	00	00	00
C3	<i>B. subtilis</i>	06	06	38%	38%
C3	<i>C. albicans</i>	01	01	7%	7%

Figura 2. Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo *Candida albicans*

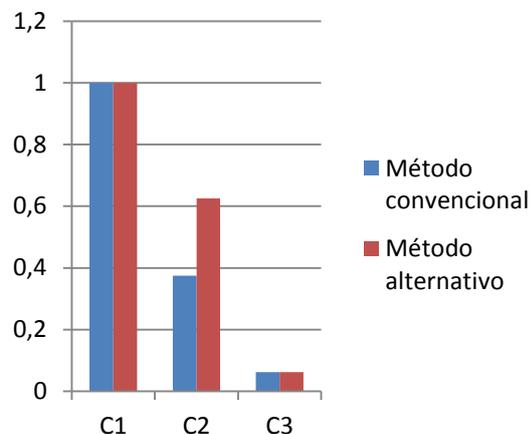


Figura 3. Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo *Staphylococcus aureus*

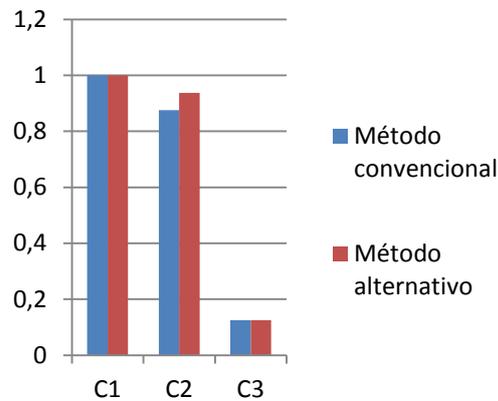


Figura 4. Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo *Aspergillus brasiliensis*

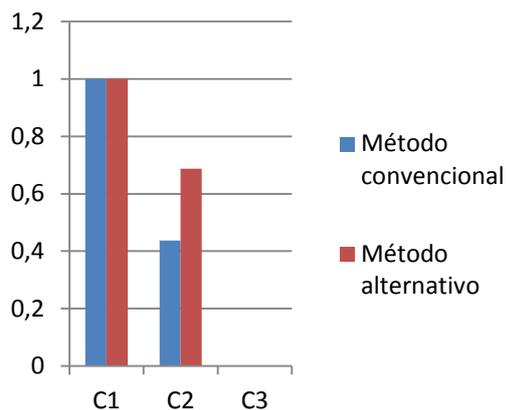


Figura 5. Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo *Clostridium sporogenes*

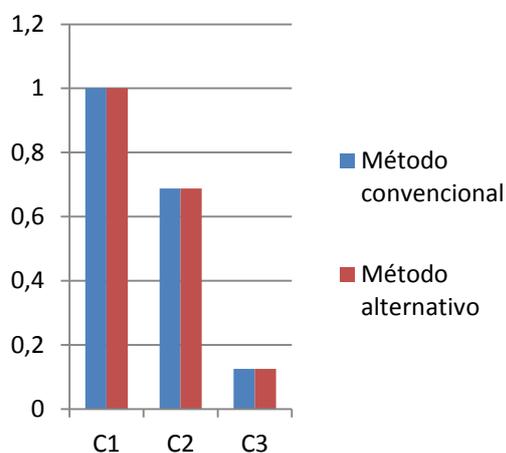
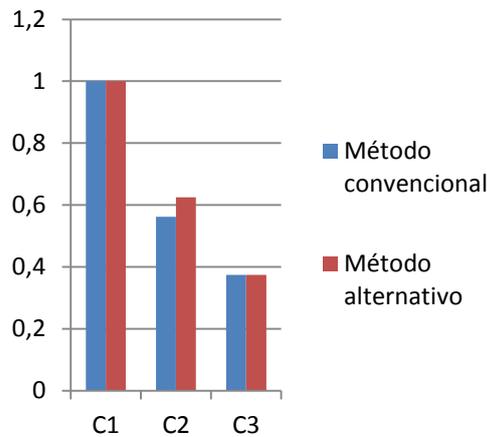


Figura 6. Percentual de positivos detectados pelos métodos convencional e alternativo após 96 horas de incubação do microrganismo *Bacillus subtilis*



5.5 Avaliação estatística de equivalência

Para análise estatística de equivalência, procurou-se avaliar o comportamento da detecção em função dos fatores: nível de contaminação, microrganismo e método. Após análise gráfica, observou-se que não foram detectadas diferenças apreciáveis entre métodos ou microrganismos, conforme pode ser verificado na **TABELA 7**, havendo diferenças entre níveis sem que, contudo, fossem observadas interações apreciáveis entre nível e método (**FIGURA 7**).

Como o tamanho de amostra utilizada é pequeno para a elaboração de estudos dos fatores em separado, foi realizado o seguinte teste de hipótese para duas proporções: a hipótese nula, proporção detectada pelo método convencional e igual à proporção do método Celsis; e a hipótese alternativa, hipótese de diferença.

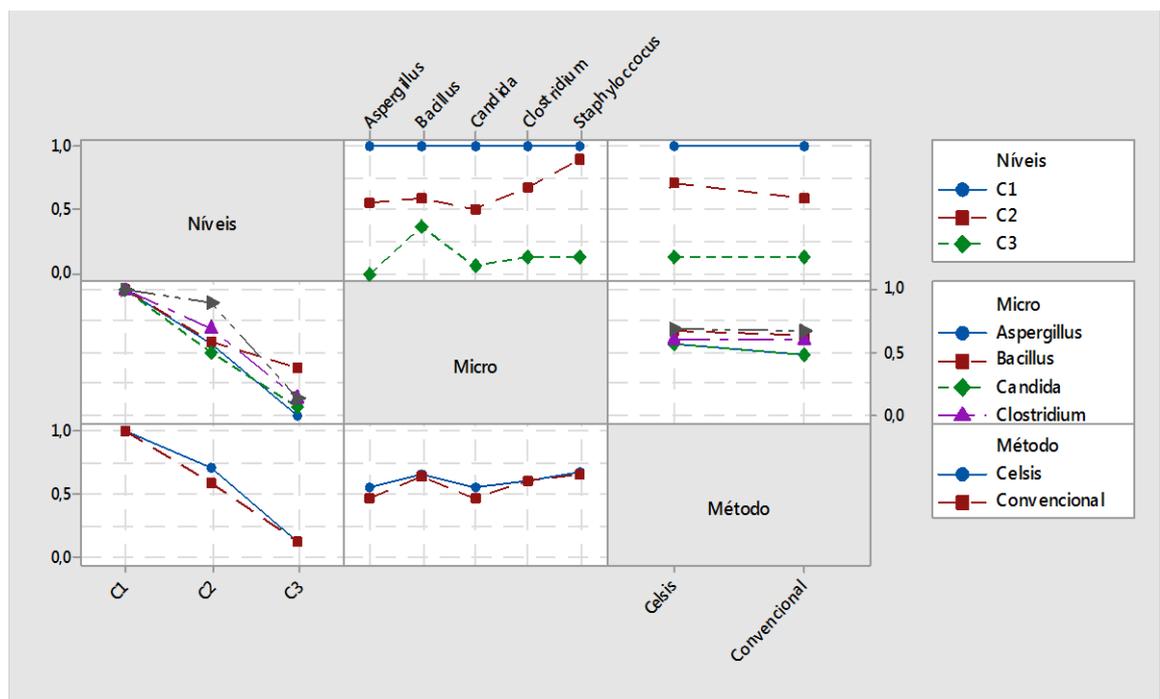
$$H_0: \pi_{CO} = \pi_{CE}$$

$$H_1: \pi_{CO} \neq \pi_{CE}$$

Tabela 7. Número total de positivos e número de testes executados nos métodos convencional e Celsis Advance™ Ampiscreen™

Método	Número de positivos	Total de testes
Celsis	148	240
Convencional	138	240

Figura 7. Comparação entre as diferenças apresentadas na proporção de detecção entre os métodos convencional e alternativo nas diferentes concentrações de inóculo (C1, C2 e C3) e nos microrganismos testados



O teste de diferença de proporções, realizado com o uso do programa Minitab 16, apresentou o resultado indicado na **FIGURA 8**. Pelo teste exato de Fisher, não há evidências que a proporção de detecção seja diferente entre os métodos, uma vez que o valor de P é menor que é 0,05.

Figura 8. Demonstração dos cálculos do programa Minitab 16

Test and CI for Two Proportions			
Sample	X	N	Sample p
1	148	240	0,616667
2	138	240	0,575000

Difference = p (1) - p (2)
Estimate for difference: 0,0416667
95% CI for difference: (-0,0460553; 0,129389)
Test for difference = 0 (vs \neq 0): Z = 0,93 P-Value = 0,352

Fisher's exact test: P-Value = **0,403**

6. DISCUSSÃO

Os produtos farmacêuticos se inserem na área de pesquisa e produção mais regulamentada de todo mundo, aspecto que se justifica plenamente diante do público-alvo de tais pesquisas. Por sua vez, os produtos em questão, (parenterais de grande volume) devem ser, necessariamente, estéreis, ou isentos de qualquer forma microbiana (BUGNO, 2001).

Neste contexto, todo o processo de fabricação desses produtos merece especial atenção no que tange as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Adicionalmente, exceto produtos enquadrados no conceito de liberação paramétrica, devem ser submetidos ao teste de esterilidade (BARRICHELO, 1997).

Se de um lado o teste de esterilidade merece estudos acadêmicos que caracterizem seu valor e também suas limitações (ALISSON 1999; MOLDENHAUER, SUTTON, 2004), hoje a microbiologia, associada à evolução tecnológica, possibilita o desenvolvimento de métodos microbiológicos rápidos em substituição ao teste convencional (SHINTANI *et al.*, 2011).

Em particular, no caso dos produtos parenterais de grande volume, nos quais a necessidade de espera de 14 dias de incubação para a realização do teste de esterilidade representa sério problema de logística, com risco de desabastecimento do mercado e possível desenvolvimento de problema de saúde pública, os métodos rápidos se tornam uma opção tão interessante quanto almejada (GRESSETT, VANHAECKE, MOLDENHAUER, 2008).

Ainda, permanecem as limitações inerentes ao teste de esterilidade convencional, particularmente no que tange à amostragem. Outras limitações podem ser minimizadas ou mesmo eliminadas com a adoção de métodos alternativos ou rápidos, nomenclaturas por vezes usadas como sinônimos dentro da Tecnologia Analítica de Processo (PAT) (READ *et al.*, 2010). Dessa forma, ao se considerar os métodos rápidos dependentes do crescimento microbiano, embora dependentes da seletividade inerente aos meios de cultura

e condições de incubação, do ponto de vista regulatório tendem à fácil aceitabilidade em virtude da maior semelhança aos métodos farmacopeicos (GRESSET *et al.*, 2008). Dentre estes métodos baseados em crescimento, optou-se, neste trabalho, por tecnologia que empregasse exatamente aqueles meios de cultura preconizados nos compêndios farmacêuticos sem modificações, apenas com o diferencial de substituição da observação visual macroscópica de turbidez ou detecção de hifas por resposta fornecida em leitura de bioluminescência de ATP empregando o sistema Celsis Advance™ AmpiScreen™, em que se preserva o número e volume de unidades testadas (DAANE, 2005). Esta particularidade conduziu à facilidade operacional de desenvolvimento paralelo entre testes convencional (método indireto) e teste rápido (método direto).

Assim, uma vantagem adicional desta tecnologia consiste em possuir, a partir de uma única filtração de amostra (conforme sua condição original ou intencionalmente contaminada), os resultados inerentes ao teste convencional e alternativo, minimizando, desta forma, o risco de falsos resultados (BUSSEY, TSUJI, 1986).

Trata-se de um trabalho envolvendo validação de método alternativo no qual se inoculou, intencionalmente, microrganismos conhecidos ao se trabalhar com os diferentes métodos. Ainda assim, em um primeiro momento, trabalhou-se com os meios de cultivo tioglicolato e caseína de soja, respeitando as orientações farmacopeicas que, por sua vez, são afeitas às características bioquímicas e fisiológicas de cada microrganismo, bem como suas condições de incubação (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013).

Segundo a literatura disponível, possíveis interferências do meio de cultura e da amostra-teste no ensaio devem ser investigadas (LACH, 2005), mas, no estudo em questão, os meios de cultura utilizados não apresentaram interferência no ensaio.

Quanto à escolha dos produtos a serem testados, optou-se pelos produtos parenterais de grande volume de maior uso hospitalar (solução fisiológica 0,9%), soluções de osmolaridade elevada (solução de dextrose 5% e Ringer lactato), além da inserção de um produto com potencial risco de incompatibilidade (metronidazol).

Justifica-se a escolha de tais produtos por se tratarem de soluções parenterais de grande volume, para as quais o grande tempo de incubação inerente ao teste de esterilidade (14 dias) ocasiona dificuldades logísticas e espaciais, nas incubadoras. Constituem-se, assim, limitações severas para os produtores, ocasionando pressões intensas das associações representativas sobre os organismos regulatórios, além de potencial risco de desabastecimento a hospitais e clínicas e, conseqüentemente, aos pacientes (MODENHAUER, SUTTON, 2004).

Adicionalmente, os produtos parenterais de grande volume se caracterizam tipicamente por formulações de líquidos de natureza hidrofílica e são adequados para aplicação como produtos pioneiros na implementação de testes alternativos, afirmação verificada no caso dos produtos solução fisiológica 0,9% e Ringer lactato. Entretanto, dentre outras soluções de elevada demanda no ambiente hospitalar, encontra-se a dextrose 5%, a qual, devido à elevada concentração osmótica, poderia se constituir em barreira ou fator limitante para o desenvolvimento microbiano, dificultando sua proliferação e recuperação (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012), podendo, eventualmente, dificultar a implementação e validação do método alternativo. Acrescenta-se a isso o fato de a solução de metronidazol 0,5% ter sua escolha definida pela possível existência de interferência no crescimento microbiano (VERDONK *et al.*, 2010; HIOM *et al.*, 2013), com eventual risco de problemas na validação do método em questão. Trata-se de antimicrobiano destinado a uso hospitalar, sendo seu emprego particularmente dirigido a pacientes portadores de infecções causadas por bactérias anaeróbias, como *Bacteroides fragilis* e outros bacteróides; *Fusobacterium sp.*; *Clostridium sp.*; *Eubacterium sp.*; e cocos anaeróbios. Esta solução é indicada, também, para a prevenção e

tratamento das infecções pós-cirúrgicas, nas quais os anaeróbios tenham sido identificados ou suspeitados (TALLY, SUTTER, FINEGOLD, 1975).

No que se refere aos microrganismos adotados no estudo de validação, optou-se pelos indicados em monografias oficiais, bem como dois isolados ambientais, *Micrococcus luteus* e *Kocuria rosea*. Dentre os microrganismos adotados pelos compêndios oficiais, tem-se *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013). No que tange aos isolados ambientais, tanto o *Micrococcus luteus* quanto a *Kocuria rosea* são microrganismos em forma de cocos Gram positivos, aeróbios, frequentemente encontrados no ar, solo e pele de indivíduos saudáveis (SAVINI *et al.*, 2010).

A importância da inclusão destes microrganismos, além do atendimento a critérios regulatórios no geral, prende-se ao fato de que representam agentes que simulam contaminantes do ambiente produtivo dos parenterais de grande volume (JIMENEZ, 2007). Assim, no evento da não obediência plena às BPFs, estarão potencialmente contaminando os produtos; devem, portanto ser fornecidas evidências de que tanto o teste de esterilidade convencional quanto o alternativo sejam aptos à sua detecção (PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013). Permanece a lacuna de outros grupos microbianos, de certa forma preenchida pelos microrganismos elencados nas farmacopeias. Se o trabalho estivesse sendo aplicado a produtos biológicos, a diversidade de microrganismos seria mais ampla, tendo em vista o risco inerente a este grupo de produtos (PARVEEN *et al.*, 2011). Vale, entretanto, ressaltar que a tecnologia de bioluminescência não tem indicação de emprego na análise de produtos biológicos, devido à presença de células de origem animal e ácidos nucleicos na constituição destes produtos, o que pode representar altas cargas de ATP nas amostras e ocasionar possível interferência nas leituras, com resultados falsos positivos (CERESA, BALL, 2005; KORCZYNSKI, 2005).

A explanação acima atende aos quesitos de que os microrganismos-desafio devem ser relevantes ao risco intrínseco do processo produtivo e às exigências à validação do método rápido (PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013).

Deve-se ter em mente que os microrganismos-desafio devem ser relevantes ao processo e ao método rápido. É recomendado que se incluam os microrganismos das seguintes categorias: Gram-positivos, Gram-negativos, fungos (bolors e leveduras), bactérias aeróbias, bactérias anaeróbias, leveduras e isolados do produto, ambiente e processos (SMITH; VON TRESS; TUBB; VANHAECKE, 2010). Existe estreita correlação entre microrganismos diferentes e suas respectivas cinéticas de crescimento (fases *lag* e *log*), temperaturas que se fazem necessárias ao seu crescimento afetando, inclusive, os tempos de incubação (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Esta diversidade deverá ser contemplada ao se estudar parâmetros de validação e estudos de equivalência entre os métodos convencional e alternativo (JIMENEZ, 2004(f)). Atenção particularizada deve ser aplicada às culturas de isolados ambientais em condições anaeróbicas e aeróbicas quando se trata de produtos fabricados em sistemas fechados, o que configura um elemento adicional de desafio ao método rápido.

No presente estudo foram utilizados materiais de referência em microbiologia, com o objetivo de diminuir a variabilidade inerente aos ensaios microbianos por se tratarem de *Bioballs*[®], matrizes padronizadas durante seu processo de fabricação. Estes materiais têm o intuito de conferir segurança e confiabilidade aos ensaios executados e, dentre suas vantagens, estão a fácil manipulação e identificação definida em nível de espécie. Adicionalmente, a análise de novas tecnologias demanda padrões microbiológicos mais precisos, compatíveis com a sensibilidade apresentada pelo método escolhido. No que diz respeito ao seu processo produtivo, as *Bioballs*[®] são desenvolvidas através de citometria de fluxo modificada, capaz de selecionar uma única célula e, após a definição do número células, as mesmas são submetidas ao processo de *freeze-drying* em nitrogênio líquido a -10 °C a vácuo. O resultado deste

processo são esferas que contêm um número pré-determinado de microrganismos (MORGAN *et al.*, 2004; PHILLIP *et al.*, 2007).

Adicionalmente ao aspecto positivo da padronização de contagem microbiana, tem-se as vantagens de que as *Bioballs*[®] se caracterizam como cepas microbianas certificadas, atendendo às Boas Práticas de Laboratório. Ainda, devido à agressividade de seu processo produtivo, as *Bioballs*[®] podem ser consideradas microrganismos estressados, constituindo condição de pior caso, altamente desejável para validação analítica em pauta (PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2013).

O controle de qualidade das *Bioballs*[®] (**TABELAS 4 e 5**) foi realizado lote a lote, de acordo com os microrganismos empregados, em testes que mostraram os certificados de análise fornecidos pelo produtor e a comparação com os resultados obtidos no controle de qualidade interno. Foi possível demonstrar que as contagens médias das *Bioballs*[®] estavam de acordo com os certificados fornecidos, o que fica explícito conforme se demonstra na **FIGURA 1**. Desse modo, através do resultado dos ensaios e achados na literatura Verdonk (2010), constatou-se que as *Bioballs*[®] tem um baixo coeficiente de variação, portanto, são adequadas para estudos de validação de métodos microbiológicos de alta sensibilidade.

O teste de esterilidade por filtração de membrana deve ser realizado através de técnica asséptica, por profissionais treinados e em ambiente compatível com sua exigência de segurança microbiológica (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013). Por este motivo, realizou-se o monitoramento ambiental da sala de trabalho (**QUADRO 7**), no qual se demonstrou a qualidade microbiológica do ambiente. Pode-se afirmar que os resultados foram satisfatórios de forma a não interferir nos resultados dos testes.

Na avaliação dos parâmetros de validação, incluem-se as características de especificidade, robustez e limite de detecção. A especificidade do método é demonstrada pela capacidade de detecção da gama de microrganismos

testados, incluindo os isolados do ambiente. Há que se considerar o fato de que, na avaliação de especificidade do método, o número de células microbianas inoculado relativamente elevado (30 UFC) indica, apenas, a compatibilidade de sua aplicação na matriz estudada. Pode-se, desta forma, inferir que os dois isolados ambientais estudados são compatíveis tanto com o método alternativo quanto com o método convencional, como nas quatro matrizes de produto. Contudo, nos estudos com a solução de metronidazol 5%, utilizou-se membrana filtrante de poro tortuoso para os ensaios com *Clostridium sporogenes*, para que o efeito antimicrobiano da solução fosse minimizado, de forma a se obter uma melhoria à técnica. Segundo estudos de Bowman (1966), a adoção da técnica de filtração com membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro na análise de antibióticos reduz a interferência de possíveis resíduos de produto no ensaio e proporciona melhores condições para proliferação de possíveis contaminantes da amostra. Quanto ao parâmetro especificidade, é possível afirmar, frente os resultados de 100% de positivos para a totalidade de microrganismos, que não foram detectadas interferências em função dos quatro diferentes lotes de produtos avaliados em cada uma das matrizes, o que representa robustez. Estudos com as tecnologias ScanRDI[®] (baseada em marcação fluorogênica), Bact/Alert[®] 3D (baseada em detecção de CO₂) e Rapid Milliflex[®] Detection System (baseada em bioluminescência de ATP), aplicadas ao teste de esterilidade, demonstraram especificidade ao detectar microrganismos oriundos de cepas de coleções de cultura e isolados do ambiente. Portanto, neste parâmetro, a tecnologia Celsis RapidScreen[®] se encontra alinhada aos outros tipos de métodos alternativos (SMITH; VON TRESS; TUBB; VANHAECKE, 2010; PARVEEN *et al.*, 2011).

A **TABELA 6** permite observar os números de resultados positivos obtidos para a cada microrganismo, considerando as 16 amostras testadas em cada um dos métodos (4 lotes x 4 testes por lote). Ao se avaliar comparativamente as concentrações de microrganismos C1 (10 UFC), C2 (2 UFC) e C3 (0,4 UFC) – conforme **TABELA 6** e **FIGURAS 1 a 6** –, é possível verificar que não foram incluídos os testes com *Pseudomonas aeruginosa*, fato que se justifica perante a limitação da quantidade de reagentes e do longo tempo de espera

para uma aquisição adicional. Tendo em vista a grande facilidade de proliferação deste microrganismo, apesar da ausência de espécie representando bactéria Gram (-), optou-se por excluir este microrganismo. Estudos de Favero e colaboradores (1971), Carson e colaboradores (1973) e Zani e colaboradores (1997) demonstram que espécies de *Pseudomonas* podem ser encontradas em água destilada, soluções desinfetantes e cateteres hospitalares após desinfecção. Adicionalmente, sua capacidade de crescimento foi demonstrada após sua exposição a ambientes de baixa densidade nutricional, em temperaturas consideradas extremas para a maioria dos microrganismos (12 °C e 50 °C).

A concentração microbiana C1 evidenciou totalidade de detecção de crescimento microbiano, igualmente à situação estudada no parâmetro especificidade. Portanto, cabe aos dados obtidos nas concentrações C2 e C3, representadas por 2 e 0,4 UFC, respectivamente, o discernimento quanto ao limite de detecção do método, diretamente atrelado à sua sensibilidade.

Assim, na concentração C2 (2 UFC), o número de resultados positivos oscilou entre 6 e 14 (38%-88%) para o método convencional, e entre 10 e 15 (63%-94%) para o método alternativo, conforme exposto na **TABELA 6**. Vislumbra-se, desta forma, uma tendência de resultados mais sensíveis para o método de bioluminescência, ao se considerar individualmente cada microrganismo. Cabe, ainda, ressaltar que os valores de menor índice de detecção (6:16 e 10:16, respectivamente) ocorreram para *Candida albicans* (**FIGURA 2**), enquanto o maior nível de detecção ocorreu com *Staphylococcus aureus* (14:16 e 15:16) no valor de 94% (**FIGURA 3**). Ainda, considera-se esta detecção a partir do período necessário de 96 horas para o método alternativo e de 14 dias para o método convencional, demonstrando uma grande vantagem do primeiro método. No trabalho de Hiom e colaboradores (2013), as tecnologias BacT/Alert 3D[®], BactiFlow[®] (baseado em marcação fluorescente) e Celsis RapidScreen[®] foram estudadas com o objetivo de melhoria na análise dos seguintes produtos preparados assepticamente: metotrexato, vancomicina, heparina e nutrição parenteral. Neste trabalho, os microrganismos de escolha

foram *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Bacillus subtilis*. A tecnologia Celsis RapidScreen[®] apresentou tempos menores para a detecção das amostras intencionalmente contaminadas, sendo uma opção interessante na análise dos produtos em questão.

O conhecimento inerente à área microbiológica, à sua variabilidade intrínseca, dirige reflexão de que inexiste diferença real entre a concentração C2 (2 UFC) e o limite de detecção desejável para o teste de esterilidade de uma célula microbiana (PINTO, KANEKO, PINTO, 2010). Apesar de uma UFC poder ser constituída por um agregado de células, novamente conceitos adotados na microbiologia tradicional equalizam uma célula a 1 UFC (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Portanto, pode-se considerar que, para as quatro matrizes farmacêuticas, com clara vantagem no tempo de detecção, a adoção do método alternativo se destaca perante o método convencional.

Ao se considerar os resultados obtidos para a concentração C3 (0,4 UFC), faz-se interessantes contribuições às reflexões quanto ao seu significado, mediante a aplicabilidade de distribuição de Poisson (ao invés de Gaussiana) aos microrganismos. Embora em um gráfico de barras ambas as distribuições se assemelhem, as suspensões microbianas irão sempre diferir de soluções homogêneas obtidas com reagentes químicos (BELIAEFFZ, MARY, 1993). Assim, trabalhou-se com número elevado de réplicas (PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2000), com o intuito de corrigir tal situação, quando alíquotas podem, de forma aleatória, carrear ou não células microbianas.

O estudo de Verdonk e colaboradores (2010) investigou o limite de detecção da tecnologia Celsis RapidScreen[®] com os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* e, de acordo com os resultados obtidos, foi possível definir com 95% de confiança o limite de detecção de 1 UFC para este método.

Considerando os resultados obtidos para C3 (0,4 UFC), tem-se para o método convencional e alternativo situação de não detecção (0:16), no caso do *Aspergillus brasiliensis* (**FIGURA 4**), ao valor de detecção (6:16) (**TABELA 6**), tanto para o método convencional quanto alternativo, no caso do *Staphylococcus aureus* (**FIGURA 3**), portanto 38% em ambos os casos, passando por percentuais de 6% para a *Candida albicans* (**FIGURA 2**) e de 13% para *Clostridium sporogenes* (**FIGURA 5**), sempre em alinhamento entre os métodos.

O baixo nível de detecção no caso do *Aspergillus brasiliensis* (**FIGURA 4**) pode ser explicado pela maior dificuldade na lise das hifas, de forma a permitir a liberação do ATP intracelular, considerado na leitura do método alternativo. Apesar de se ter, em todos os casos, aplicado agitação de vortex durante 30 segundos, a constituição deste microrganismo (quitina) (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012), associada a outras características que dificultam ainda mais uma transferência homogênea, certamente foi aspecto preponderante. Também no caso da *Candida albicans*, apesar de seu nível maior de ATP interno, o crescimento caracterizado por cinética distinta das bactérias, assim como maior dimensão celular, justifica tais particularidades. A mesma dificuldade não foi encontrada nos estudos com o *Clostridium sporogenes* (**FIGURA 5**), apesar de sua característica estritamente anaeróbica.

La Duc e colaboradores (2007), tendo realizado a quantificação de ATP intracelular de microrganismos em estado de estresse, observou que a quantidade de ATP presente nos microrganismos estaria diretamente relacionada à sua espécie, estado fisiológico e nutricional no momento da quantificação. Brovko, Romanova e Ugarova (1994) realizaram experimento de quantificação de ATP microbiano de células em diferentes estados nutricionais, meios de cultura e exposição à radiação, notando diferenças nas quantidades de ATP intracelular. As diferenças de detecção entre espécies podem ser explicadas de acordo com o perfil metabólico de cada uma visto que as tiveram condições de cultivo consideradas ótimas a partir da observância às suas particulares.

A utilização dos dados e de percentuais de positivos, considerando as três concentrações, permitiu a construção da **FIGURA 7**, que permite visualizar o comportamento da detecção microbiana em função dos níveis de concentração, do microrganismo e do método (convencional e alternativo). Pela análise gráfica não foram detectadas diferenças apreciáveis entre métodos ou microrganismos; houve diferenças entre níveis, mas não se observaram interações apreciáveis de nível de concentração e método.

Como o tamanho da amostra é pequeno para fazer estudos dos fatores em separado, foi feito o teste de hipótese para duas proporções: a hipótese nula, na qual a proporção detectada pelo método convencional é igual à proporção do método alternativo, e a hipótese alternativa, considerada a hipótese da diferença.

$$H_0: \pi_{CO} = \pi_{CE}$$

$$H_1: \pi_{CO} \neq \pi_{CE}$$

A partir dos dados coletados, foi obtida a **TABELA 7**, na qual se quantificou o número de testes positivos de cada tecnologia, sendo que o maior número de positivos foi apresentado quando do emprego do método Celsis® (técnica de bioluminescência de ATP). O teste de diferença apresentou o resultado apresentado na **FIGURA 8**, através de demonstração dos cálculos realizados pelo programa Minitab 16. Pelo teste exato de Fisher ($p > 0,05$), não há evidências de que a proporção de detecção seja diferente entre os métodos (p-valor encontrado 0,403).

Uma consideração pertinente é aquela anteriormente apontada, no que tange à concentração C2 (**TABELA 6**), com destaque para as vantagens do método alternativo.

As interferências em dias diferentes de ensaio, analistas e lotes de meio de cultura foram observadas sem que houvesse mudança significativa nos resultados dos testes e, embora esta observação não possa ser considerada como estudo de robustez, ela demonstra a grande consistência dos resultados obtidos. Há de se considerar a limitação do usuário do equipamento em desenvolver um amplo estudo caracterizando a robustez do método, tendo em vista que parâmetros do equipamento só podem ser deliberadamente alterados pelo seu fabricante.

Tendo em vista a proposta de expor um estudo com vistas à validação de método alternativo qualitativo por bioluminescência e, embora limitações específicas impeçam a plena avaliação de todos os parâmetros para se proceder à efetiva validação do método em questão, deve ser considerado o fato de que trabalhos publicados sobre o tema (VERDONK *et al.*, 2010; HIOM *et al.*, 2013) apresentam resultados satisfatórios com o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando a sensibilidade e especificidade da tecnologia Celsis RapidScreen[®] em amostras contendo esse microrganismo.

Em vista dos resultados obtidos no presente, assim como na revisão da literatura efetuada, pode-se concluir que a tecnologia de bioluminescência de ATP é uma opção interessante para análise de produtos estéreis, podendo oferecer, em algumas situações, resultados mais rápidos que o método convencional. Apesar de não ser uma tecnologia extremamente rápida e ainda permanecer dependente de limitações inerentes aos métodos baseados em crescimento, a técnica de bioluminescência de ATP pode ser caracterizada como um grande avanço na microbiologia farmacêutica.

7 . CONCLUSÕES

- As diferentes soluções parenterais de grande volume, tanto solução fisiológica 0,9%, quanto solução de dextrose 5%, solução de metronidazol 0,5% ou Ringer lactato, são passíveis de aplicação ao teste de esterilidade empregando a técnica de bioluminescência de Adenosina Trifosfato (ATP);
- O teste de esterilidade por bioluminescência de ATP apresentou resultados satisfatórios no parâmetro de especificidade, com adoção dos seguintes microrganismos farmacopeicos: *Aspergillus brasiliensis*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e dois isolados ambientais *Micrococcus luteus* e *Kocuria rosea*;
- O teste de esterilidade por bioluminescência de ATP apresentou sensibilidade equivalente à do método convencional nos níveis de concentração microbiana de 10 UFC e 0,4 UFC, e superior a este no nível de concentração de 2 UFC;
- Os métodos convencional e alternativo mostraram-se resistentes a variações de lote e ao estresse microbiano, embora não tenham sido desenvolvidos estudos que permitam inferir a robustez do segundo método;
- Existe equivalência de resultados entre os métodos convencional e alternativo empregando bioluminescência de ATP, conforme teste estatístico aplicado;
- Tanto o método alternativo quanto o convencional apresentam equivalência estatística quanto ao tempo de detecção da resposta do teste de esterilidade; e

- É factível a substituição do teste de esterilidade convencional pelo alternativo por bioluminescência de ATP para os seguintes produtos: solução fisiológica 0,9%, solução de metronidazol 0,5%, solução de dextrose 5% e Ringer lactato. Contudo, é imprescindível que todos os parâmetros de validação sejam previamente efetuados *in situ*, com resultados satisfatórios.

REFERÊNCIAS

AKERS, J.; AGALLOCO J. Sterility and sterility assurance. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.51, n.2, p.72-77, 1997.

AKERS, M.J.; LARRIMORE, D.S.; GUAZZO, D.M. **Parenteral quality control: sterility, pyrogen, particulate and package integrity testing**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2003. p.2-109. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v. 125).

ALLISON, D.G. A review: taking the sterile out of sterile. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, n.6, p.789-793, 1999.

ANDON, M.B. Active vs. passive air (Settle Plate) monitoring in routine environmental monitoring programs. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.60, n.6, p.350-355, 2006.

AVALLONE, H. Control aspects of aseptically produced products. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.39, n.2, p.75-79, 1985.

BAGHATE, H.; LAZZARI, D.; CAMERON, H.; MCKAY, D. The incubation period in sterility testing. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.47, n.5, p.254-258, 1993.

BARRICHELO, A. Teste de esterilidade e liberação paramétrica. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.33, supl.1, p.33-39, 1997.

BELIAEFZZ, B.; MARY, Y.J.F. The "most probable number" estimate and its confidence limits. **Water Research**, v.27, n.5, p.99-805.1993.

BILL, A. Microbiology laboratory methods in support of the sterility assurance system. In: AVIS, E.K.; LIEBERMAN, A.H.; LACHMAN, L. NEMA, S.; LUD WIG, J.D. **Pharmaceutical dosage forms: parenteral medications**. 3.ed. New York: Informa Healthcare, 2010. [v.2: Facility design, sterilization and processing].

BOWMAN, W.F. Application of membrane filtration to antibiotic sterility testing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.55, n.8, p.818-821, 1966.

BRITISH Pharmacopoeia 2010. London: Stationery Office, 2009. p.A730-A742.

BROVKO, L.Y.; ROMANOVA, N.A.; UGAROVA, N.N. Bioluminescent assay of bacterial intracellular AMP, ADP and ATP with the use of three-enzyme reagent (adenylate kinase, pyruvate kinase, and firefly luciferase). **Analytical Biochemistry**, v.220, n.2, p.410-414, 1994.

BROWN, M.R.W.; GILBERT, P. Increasing the probability of sterility of medicinal products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.29, n.1, p.517-523, 1977.

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

BUGNO, A. **Esterilidade**: validação de metodologia e propostas de otimização de resultados. São Paulo, 2001. 140p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BUSSEY, M.D.; TSUJI, K. Bioluminescence for USP sterility testing of pharmaceutical suspension products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, n.2, p.349-355, 1986.

CALHOUN, P.M.; WHITE, M.; BOWMAN, W.F. Sterility testing of insulin by membrane filtration: a collaborative study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.55, n.7, p.1022-1024, 1970.

CARSON, L.A.; FAVERO, M.S.; BOND, W.W.; PETERSEN, N.J. Morphological, biochemical, and growth characteristics of *pseudomonas cepacia* from distilled water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.25, n.3, p.476-483, 1973.

CERESA, L.; BALL, P. Using ATP bioluminescence for microbiological measurements in pharmaceutical manufacturing. In: MILLER, M.J., ed. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2005. v.2, cap.9, p.233-250.

CLONTZ, L. **Microbial limit and bioburden tests**: validation approaches and global requirements. Buffalo-Grove: CRC Press, 2008. p.223-261.

COSSLET, G.A. The design of controlled environments. In: DENYER, S.P.; BAIRD, R.M., eds. **Guide to microbiological control in pharmaceutical and medical devices**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. cap.4.

DAANE, L. ATP bioluminescence using the celsis system. In: MILLER, M.J., ed. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2005. v.2, cap.7, p.175-192.

EUROPEAN COMMISSION. **EU Guidelines to good manufacture practice medicinal products for human and veterinary use**: manufacture of sterile medicinal products. Bruxelles: Commission Européenne, 2008. v.4, anexo 1, 16p. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf. Acesso em: 25 fev. 2014.

EUROPEAN COMMISSION. **Final Version of Annex 17 to the EU Guide to Good Manufacturing Practice**: Title Parametric Release. Bruxelas. 2001. 5p. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/pdfs-en/v4an17_en.pdf. Acesso em: 25 fev. 2014.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 6.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2008. p.155-159, 532-543.

FARMACOPEIA Brasileira. 5.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. p.253-261, 330-336.

FAVERO, M.S.; CARSON, L.A.; BOND, W.W.; PETERSEN, N.J. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. **Science**, v.173, n.3999, p.836-838, 1971.

FITZGERALD, A.E. Regulatory recognition and acceptance. In: EASTER, M.C., ed. **Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry**. Washington: Interpharm/CRC. 2003. cap.13, p.149-156.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry**: sterile drug products produced by aseptic processing – current good manufacture practicing. Rockville: FDA, 2004. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070342.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry**: validation of grow-based rapid microbiological methods for sterility testing of cellular and gene therapy cells. Rockville: FDA, 2008. Disponível em: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/CellularandGeneTherapy/ucm072612.htm>. Acesso em: 30 mar. 2012.

GREEN, S.; RANDELL, C. Rapid microbiological methods explained. In: HALLS, N., ed. **Microbiological contamination control in pharmaceutical clean rooms**. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap.7, p.157.

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

HABERER, K. Terminal sterilization and parametrical release. In: WILLIAMS, L.K., ed. **Microbial contamination control in pharmaceutical manufacture**. New York: Informa Healthcare, 2004. cap.13, p.378-403. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 140).

HALLS, N. Effects and causes of contamination of contamination in sterile manufacturing. In: HALLS, N., ed. **Microbiological contamination control in pharmaceutical clean rooms**. Boca Raton: CRC Press, 2002. cap.1.

HALLS, N. Microbiological environmental monitoring. In: HALLS, N., ed. **Microbiological contamination control in pharmaceutical clean rooms**. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap.2.

HIOM, S.; DENYER, S.; TALBOT, C.; MAILLARD, JY.; SPARK, P.; SMITH, J. A preliminary Investigation into the ability of three rapid microbiological methods to detect microorganisms in hospital intravenous pharmaceuticals. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.67, n.4, p.376-385, 2013.

HOCK, C.S.; CONSTANCE, R.X.N.; WAH, L.C. Toward higher QA: from parametric release of sterile parenteral products to PAT for other pharmaceutical dosage forms. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.66, n.4, p.371-391, 2012.

JIMENEZ, L. Adenosine triphosphate bioluminescence analysis for rapid screening of microbial contamination in non-sterile pharmaceutical samples. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.58, n.3, p.159-168, 2004a.

JIMENEZ, L. Environmental monitoring. In: _____, ed. **Microbial contamination control in the pharmaceutical industry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004b. cap.5, p.103-132. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 142).

JIMENEZ, L. Rapid methods for pharmaceutical analysis. In: _____, ed. **Microbial contamination control in the pharmaceutical industry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004c. cap.7, p.147-182. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 142).

JIMENEZ, L. Sterility test and procedures. In: _____, ed. **Microbial contamination control in the pharmaceutical industry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004d. cap.4, p.77-102. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 142).

JIMENEZ, L. Rapid methods of microbial identification. In: _____, ed. **Microbial contamination control in the pharmaceutical industry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004e. cap.4. (Drugs and the pharmaceutical sciences, 142).

JIMENEZ, L. Rapid methods for the microbiological surveillance of pharmaceuticals. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.58, n.3, p.159-168, 2004f.

JIMENEZ, L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.61, n.5, p.383-397, 2007.

KORCZYNSKI, S.M. The importance of emerging rapid methods technology to regulators and industry. In: MILLER, M.J., ed. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2005. v.1, cap.3, p.65-94.

LA DUC, M.T.; DEKAS, A.; OSMAN, S.; MOISSEL, C.; NEWCOMBE, D.; VENKATESWARAN, K. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, n.8, p.2600-2611, 2007.

LACH, V. Selection and validation of celsis advance ATP analysis system for product release testing for non-sterile pharmaceuticals. In: MILLER, M.J., ed. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2005. v.2, cap.8, p.193-232.

MARINO, G.; MAIER, C.; CUNDELL, M.A. A comparison of MicroCount™ digital system to plate count and membrane filtration methods for the enumeration of microorganisms in water for pharmaceutical purposes. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.54, n.3, p.172-192, 2000.

MARSHALL, V.; POULSON-COOK, S.; MOLDENHAUER, J. Comparative mold and yeast recovery analysis (the effect of differing incubation temperature ranges and growth media). **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.52, n.4, p.165-170, 1998.

MOLDENHAUER, J. PDA technical report n.33: evaluation, validation and implementation of new microbiological testing methods. In: MILLER, M.J., ed. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2005. v.1, cap.14, p.283-300.

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

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

NEWBY, P.J. Obstacles and opportunities to the introduction of pharmaceutical rapid microbiological methods. In: MILLER, M.J., ed. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2005. v.1, cap.4, p.95-104.

NEWBY, J.P.; JONHSON, B. Overview of alternative rapid microbiological technologies. In: EASTER, C.M., ed. **Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry**. Boca Raton: Interpharm/CRC, 2003. cap.4.

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION. Evaluation, validation and implementation of new microbiological test methods: technical report n.33. **Parenteral Journal of Science and Technology**, v.54, n.3, suppl.TR33, p.1-39, 2013. Disponível em: <http://cdn2.hubspot.net/hub/54227/file-14538112-pdf/docs/tr33.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2014.

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

PHARMACEUTICAL INSPECTION CONVENTION. **Recommendation on Guidance on Parametrical Release**. PIC/S Secretariat, 2007. 21p. Disponível em: http://www.picscheme.org/pdf/24_pi-005-3-parametric-release.pdf. Acesso em: 25 fev. 2014.

PHILLIP, W.J.; VAN IWAARDEN, P.; SCHIMMEL, H.; MEEUS, N.; KOLLMORGEN, N. Development of reference materials for microbiological analysis. **Accreditation and Quality Assurance**, v.12, n.3/4, p.134-138, 2007.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p.451-485, p.245-283.

PITTMAN, M. A study of fluid thioglycollate for the sterility test. **Journal of Bacteriology**, v.51, n.19, p.19-32, 1946.

READ, E.K.; SHAH, R.B.; RILEY, B.S.; PARK, J.T.; BRORSON, K.A.; RATHORE, A.S. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products: Part II: concepts and applications. **Biotechnology and Bioengineering**, v.105, n.2, p.285-295, 2010.

SANDLE, T. Sterility test failure investigations. **GPX Journal**, v.16, n.1, p.66-73, 2012.

SARTORIUS INDUSTRY. Lab Products et Services. Filtration/Purification.2013. p.94. Disponível em: <http://www.sartorius.com>. Acesso em: 13 jul. 2014.

SAVINI et al. Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 59, p. 1395-1402. 2010.

SCHROEDER, G.H. Sterility failure analysis. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.59, n.2, p.89-95, 2005.

SHINTANI, H.; SAKUDO, A.; MCDONNELL, G. Methods of rapid microbiological assay and their application to pharmaceutical and medical device fabrication. **Biocontrol Science**, v.16, n.1, p.13-21, 2011.

SHINTANI, H. Rapid assay of bioburden, endotoxin and other contamination. **Journal of Chromatography Separation Techniques**, v.4, n.8, p.1-7, 2013.

SMITH, R.; VON TRESS, M.; TUBB, C.; VANHAECKE, E. Evaluation of the ScanRDI as a rapid alternative to the pharmacopoeial sterility test method: comparison of the limits of detection. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.64, n.4, p.356-363, 2010.

SUTTON, S. **Environmental monitoring in clean rooms and control environment**. Informa Healthcare, 2006. p.71-92.

SUTTON, V.W.S. Opportunities for the Pharmaceutical Industry. In: MILLER, M.J., ed. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2005. v.1, cap.6, p.123-156.

SUTTON, V.W.S. The compendial sterility tests. In: NEMA, S.; LUDWIG, J.D. **Pharmaceutical dosage forms: parenteral medications**. 3.ed. New York: Informa Healthcare, 2010. cap.7. [Volume 2: Facility design, sterilization and processing].

TALLY P.F.; SUTTER, L.V.; FINEGOLD, M.S. Treatment of anaerobic infections with metronidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.7, n.5, p.672-675, 1975.

TIRUMALAI, S.R. Current USP perspectives on validation of alternative microbiological methods: proposed general information chapter <1223>. In: MILLER, M.J., ed. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2005. v.1, cap.13, p.273-282.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p.157-162.

UNITED STATES. General Services Administration. **Federal Standard 209E**: airborne particulate cleanliness classes in clean rooms and clean zones. Mount Prospect: Institute of Environmental Sciences, 1992. 56p. Disponível em: <http://www.set3.com/papers/209e.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2014.

UNITED STATES. Government. Code of Federal Regulations. **Title 21**: food and drugs. Washington: United States Government Printing Office, 2012. alínea 610. 12.ed. 4-1-12. 2012. Disponível em: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2012-title21-vol3/pdf/CFR-2012-title21-vol3.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2014.

UNITED STATES Pharmacopeia: USP36; The National Formulary: NF31. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013. p.64-69, 776-783.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General Requirements for the Sterility of Biological Substances**. Anexo 4. 1973. Disponível em: http://www.who.int/biologicals/vaccines/sterility_testing/en/. Acesso em: 07 jun. 2013.

ZANI, F.; MINUTELLO, A.; MAGGI, L.; SANTI, P.; MAZZA, P. Evaluation of preservative effectiveness in pharmaceutical products: the use of a wild strain of *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, n.3, p.322-326, 1997.