

D O S S I Ê T É C N I C O

**Controle de esterilização em produtos odonto-
médico hospitalares**

Carmen Etsuko Kataoka Higaskino

Izabel Cristina Figel

Maria Paula Assis Yamada

Instituto de Tecnologia do Paraná

**Outubro
2007**

Sumário

1 INTRODUÇÃO	2
2 LEGISLAÇÃO	3
3 ESTERILIZAÇÃO	3
3.1 Autoclave	3
3.2 Esterilização por radiação	4
3.3 Estufa	4
3.4 Óxido de etileno	4
3.5 Plasma de hidrogênio	4
3.6 Ácido peracético	4
3.7 Ácido peracético-plasma	5
3.8 Formaldeído e vapor de formaldeído	5
4 CONTROLE DE ESTERILIZAÇÃO	5
4.1 Indicadores mecânicos	5
4.2 Indicadores químicos	5
4.3 Controles biológicos	6
5 DESCRIÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE	6
5.1 Controle da esterilidade dos meios de cultura	7
5.2 Teste de promoção de crescimento dos meios de cultura	7
5.3 procedimento de limpeza das áreas assépticas	7
5.4 Procedimentos para descontaminação da superfície externa do material teste	7
5.5 Superfície dos materiais utilizados no ensaio	8
5.6 Amostragem	8
5.7 Atividade bacteriostática e fungistática do material analisado	8
5.8 Interpretação	8
5.9 Controle ambiental durante o ensaio	9
6 MÉTODO DE FILTRAÇÃO POR MEMBRANA	9
7 MÉTODO DE INOCULAÇÃO DIRETA	10
8 VALIDAÇÃO DO ESTUDO	11
9 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS	11
Conclusões e recomendações	11
Referências	12
Anexo – Fotos do ensaio de esterilidade pelo método inoculação direta	13

Título

Controle de esterilização em produtos odonto-médico hospitalares

Assunto

Materiais para medicina e odontologia

Resumo

Fornecer informações sobre o teste de esterilidade bacteriana e fúngica para insumos farmacêuticos, medicamentos e correlatos estéreis. Descrever os tipos de esterilização disponíveis, os métodos de ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica como uma das ferramentas para controlar a qualidade microbiológica de materiais estéreis.

Palavras-chave

Autoclave; controle microbiológico; descontaminação; esterilização; estufa; produto estéril

Conteúdo

1 INTRODUÇÃO

O teste de esterilidade é realizado para avaliar se o lote de um produto apresenta contaminação bacteriana ou fúngica, para que o teste tenha validade deve-se levar em conta o número de unidades do lote (amostragem estatística), podendo então determinar quantas unidades devem ser analisadas, antes da liberação do lote.

Dentro da definição restrita de esterilidade, uma amostra deve ser considerada estéril só quando há ausência completa de microrganismos viáveis nela. Contudo, esta definição absoluta não pode aplicar-se corretamente a um lote inteiro do produto devido a limitações no ensaio.

No teste de esterilidade de referência, pode ocorrer a não detecção da contaminação microbiana se ela estiver presente somente em uma pequena parte do lote, mas não havendo alternativas não destrutivas da amostra teste, esta limitação deve ser aceita (ANVISA, 1997).

Quando há evidência da contaminação microbiana na amostra obtida pelo método apropriado, o resultado obtido é evidência conclusiva da falha da amostra e, conseqüentemente, do processo de fabricação (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2005).

A probabilidade de detectar microrganismos viáveis no teste de esterilidade aumenta com o número de organismos presentes numa determinada quantidade da preparação a ser testada e varia de acordo com a espécie do microrganismo. A amostragem ao acaso de um lote não pode detectar, com certeza, níveis muito baixos de contaminação que não seja uniforme em todo o lote, sendo que o teste de esterilidade por si só não oferece segurança absoluta sobre a ausência de contaminação microbiana em todas as outras amostras (INCQS, 1984). Então, a importância da utilização de outras ferramentas existentes para a avaliação da qualidade seja da matéria-prima ou produto final, como: ensaio de pirogênio "in vivo", endotoxina bacteriana, citotoxicidade e outros.

Os produtos submetidos ao teste de esterilidade são: soluções parenterais de pequeno e

grande volume, produtos oftálmicos, produtos odontológicos, medicamentos estéreis, bolsas de sangue, agulhas seringas, escalpes, equipos e outros.

A característica de esterilidade foi inicialmente requerida em produtos para uso parenteral. Mas, após inúmeros casos de infecção advindas da terapia oftálmica, e posterior constatação da má qualidade destes produtos quanto ao aspecto microbiano, foi exigido também, que estes medicamentos atendam os requisitos do teste de esterilidade.

2 LEGISLAÇÃO

A lei n. 6.360, de 23 de setembro de 1976 que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos e o decreto 79.094, de 5 de janeiro de 1977 que regulamenta a lei 6.360 são as legislações que regulamentam de uma forma abrangente os medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos.

Para o teste de esterilidade existem legislações para alguns produtos mais específicas como: a Portaria Interministerial n. 3, de 01 de julho de 1988 que aprova o Regulamento Técnico n. RT-008/87 - "Bolsas Plásticas para Acondicionamento de Sangue Humano e seus Componentes". A Portaria n. 950, de 26 de novembro de 1998 SVS/MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária que aprova o Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes. A Portaria n. 500, de 09 de outubro de 1997 da ANVISA que aprova o Regulamento Técnico de Soluções Parenterais de Grande Volume - SPGV e seus Anexos. A resolução RDC n. 46, de 18 de maio de 2000 da ANVISA que normatiza os processos de produção e Controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados para uso humano. Entre outras.

A Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT possui normas para produtos médicos hospitalares, como por exemplo: Para seringas a NBR ISSO 7886-1 que trata de seringa hipodérmica estéril para uso único - Parte 1: seringa para uso manual e a NBR ISSO 8537 que trata sobre seringas estéreis de uso único, com ou sem agulhas, para insulina, para equipos de infusão e de uso único; a NBR 14041 para equipo de transfusão para uso único; a NBR 14168, entre outras.

Quando da realização de testes de esterilidade, deve-se verificar a última atualização da legislação ou norma vigente de um determinado material teste. A referência para o teste de esterilidade é a UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) na sua última edição.

3 ESTERILIZAÇÃO

Segundo Bruch e Bruschi (1971), esterilização é o processo pelo qual os microrganismos vivos são removidos ou mortos a tal ponto que não seja mais possível detectá-los no meio de cultura padrão no qual previamente haviam proliferado (ZANON; NEVES, 1987).

3.1 Autoclaves

Sua ação esterilizante se dá pela coagulação das proteínas, que é causada pela ruptura das pontes de hidrogênio das bactérias. Este é o processo de esterilização indicado para a maioria dos instrumentos cirúrgicos a não ser que o material a ser esterilizado possa ser danificado pelo calor e umidade. Vapor saturado sob pressão. O agente esterilizante é o calor e a umidade. Umidade 100% relativa (saturação). Penetração do vapor saturado que condensa o calor + precipitação da umidade (umidifica o microrganismo, amolecendo até a quebra capsular, destruindo os esporos). Validade da esterilização: 7 a 15 dias. O perfeito funcionamento do equipamento de autoclave deve ser avaliado periodicamente (ERWIN GUTH).

3.2 Esterilização por radiação

Sua ação esterilizante se processa através da alteração da composição molecular das células, as quais sofrem perda ou adição de cargas elétricas (ionização), ficando carregadas negativa ou positivamente. A esterilização por irradiação é obtida através dos Raios Gama Cobalto a 60°C. É um método eficaz e oferece como vantagens ser altamente penetrante, atravessando o invólucro dos materiais embalados em não tecido ou papel grau cirúrgico e não danifica o material submetido ao processo, por ser frio, ex: peças cromadas e artigos termossensíveis (ERWIN GUTH).

3.3 Estufa

Sua ação esterilizante resulta em destruição bacteriana que se dá pela oxidação celular. Uma forma de esterilização por calor seco é a esterilização em ar quente. Os materiais a serem esterilizados por este método são colocados em um forno, a uma temperatura de aproximadamente 170°C e mantida por cerca de 2 horas. Os instrumentos que tenham algum componente de material têxtil ou de borracha não podem ser esterilizados pelo calor seco. É pouco utilizado em hospitais, porém é mais utilizado em consultórios médicos e odontológicos (ERWIN GUTH) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

3.4 Óxido de etileno

Sua atividade depende da desnaturação das proteínas. O óxido de etileno mata todos os microrganismos e endósporos, mas requer um tempo de exposição prolongado 4 a 18 horas. Ele é tóxico e explosivo em sua forma pura, assim, normalmente é misturado a um gás não inflamável, como o dióxido de carbono ou nitrogênio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

No Brasil, a legislação específica sobre funcionamento de centrais de esterilização por óxido de etileno é a Portaria Interministerial n. 4, de 31 de julho de 1991, que estabelece normas técnicas para o uso, o manuseio, o cadastro, as instalações e as condições limites de operação e de segurança do ambiente e do pessoal, em unidade de esterilização de materiais, pelo processo de gás de óxido de etileno puro ou de suas misturas com gás inerte liquefeito. No entanto, as questões relacionadas aos ciclos, tipo de gás e aeração não estão contempladas, embora constem os limites máximos de resíduos aceitáveis para os diferentes tipos de materiais (CIH HOEFEL).

As vantagens é que podem ser esterilizados materiais sem danificá-los (CIH HOEFEL) e é altamente penetrante (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). As desvantagens: alto custo, toxicidade, e tempo longo do ciclo e atoxicidade (CIH HOEFEL).

3.5 Plasma de hidrogênio

Plasma de água oxigenada (H₂O₂) - quarto estado da matéria: sólido, líquido, gás e plasma. O plasma gerado a partir do peróxido de hidrogênio apresenta-se constituído de radicais livres e de mais formas químicas altamente reativas interagindo com as membranas celulares, com ação bactericida, esporicida, fungicida e virucida. Tempo de exposição para esterilização: 75 minutos à temperatura de 40 a 55° C.

Utilizado para materiais e artigos termossensíveis, aparelhos elétricos, endoscópios, serras e instrumentais. Atóxico, altamente eficaz e alta penetrabilidade. Nome comercial: STERRAD® (ERWIN GUTH).

3.6 Ácido peracético

Sua ação esterilizante se dá pela ação oxidante e atua na parede celular e no interior da célula, danificando o sistema enzimático, destruindo o microrganismo. O agente esterilizante é o ácido acético. É um método totalmente automático. Tempo de exposição para esterilização 30 a 45 minutos, à temperatura de 50 a 55°C. Atóxico e alto custo (ERWIN GUTH).

3.7 Ácido peracético-plasma

São dois os agentes ativos. O primeiro é o ácido peracético (5%) com peróxido de hidrogênio (22%) e o segundo é o ácido peracético com uma mistura de gás argônio com O₂ e H₂ do qual irá ser formado o plasma. As fases de plasma são alternadas com fases de vapor. Indicação: materiais termossensíveis, temperatura: 50°C, não é necessária aeração, não processa líquidos, limitado a uso de materiais de aço. Preferir embalagens de polipropileno e poliolefinas (CIH HOEFEL).

3.8 Formaldeído e vapor de formaldeído

Formaldeído é um monoaldeído que existe como um gás solúvel em água. Embora tenha sido usado durante muitos anos, seu uso foi reduzido com o aparecimento do glutaraldeído. Suas desvantagens principais estavam relacionadas a menor rapidez de ação e carcinogenicidade. Embora tido como carcinogênico, isto foi demonstrado a altas doses de exposição.

Ampla espectro de ação, inclusive contra esporos. Ativo na presença de proteínas, mas em testes realizados, a adição de 40% de proteína necessitou de concentração dobrada de formaldeído. Exposição máxima no ambiente é de 0,1 a 0,5 ppm. Biodegradabilidade: 1 a dois dias. Tóxico (CIH HOEFEL).

O vapor de formaldeído é gerado em máquina própria a partir de formaldeído a 2%. É mais utilizado na Inglaterra. É indicado para materiais termossensíveis. As embalagens devem ser papel grau cirúrgico. O indicador biológico de esterilização é o *B. stearothermophilus* (CIH HOEFEL).

A escolha do processo de esterilização depende da natureza do artigo a ser esterilizado, vários artigos hospitalares são termossensíveis, o que inviabiliza a escolha de um processo de forma generalizada. Atualmente, vem se intensificando estudos e discussão, no tocante ao estabelecimento de critérios, para diferenciar e aplicar corretamente os processos de esterilização, tendo como principal objetivo o controle das infecções hospitalares (CARVALHO).

4 CONTROLE DE ESTERILIZAÇÃO

Os indicadores que demonstram a eficácia dos métodos de esterilização podem ser mecânicos, químicos e biológicos. São utilizados mais frequentemente para métodos automatizados.

4.1 Indicadores mecânicos

Monitores de tempo, temperatura, pressão, relatórios impressos computadorizados.

4.2 Indicadores químicos

Indicam se a temperatura no interior da câmara atingiu a desejada, entretanto não indicam absolutamente a esterilização. Estes indicadores podem ser fitas impregnadas com tinta que muda de cor ao atingir uma determinada temperatura. Podem ser fitas adesivas e tiras de papel reagente (LEME, 1990).

Classificados em: Classe 1 ou indicadores de processo; Classe 2 ou indicadores para uso em testes específicos; Classe 3 ou indicadores monoparamétricos; Classe 4 ou indicadores multiparamétricos; Classe 5 ou indicadores integradores e Classe 6 ou indicadores emuladores (indicadores de verificação de ciclos).

4.3 Controles biológicos

São testes utilizados para monitorizar o processo de esterilização, consistindo em uma suspensão padronizada de esporos (usualmente esporulados) conhecidos como resistentes ao modo de esterilização a ser monitorizado. Podem ser encontrados no mercado como tiras de papel impregnadas com esporos dos bacilos e ampolas.

5 DESCRIÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE

O Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica tem como finalidade verificar a ausência de bactérias e fungos em materiais sólidos estéreis (equipos, medicamentos sólidos, etc.) e líquidos estéreis (soluções fisiológicas, medicamentos líquidos, etc.).

Este ensaio deve ser realizado sob rigorosas condições de assepsia e controle do nível de contaminação ambiental para evitar a contaminação dos materiais em análise. Os ensaios devem ser realizados em capela de fluxo laminar vertical (Classe 100) ou cabine de segurança biológica, localizados em áreas controladas. A capela de fluxo laminar e/ou cabine de segurança biológica deve ser avaliada periodicamente, quanto ao número de partículas em suspensão, velocidade, uniformidade do fluxo de ar e vazamento nos filtros. A avaliação é feita de acordo com o Plano Anual de Manutenção.

A sala asséptica e a capela de fluxo laminar devem ser monitoradas quanto ao número de microrganismos contaminantes.

As áreas controladas devem ser restritas e o acesso deve ser limitado às pessoas ligadas à atividade.

Os técnicos devem receber treinamento nas metodologias específicas, em técnicas assépticas, de limpeza/desinfecção e controle ambiental, e ter registrada sua qualificação para realização dos ensaios.

O comportamento no interior da sala asséptica deve obedecer a regras básicas como falar o mínimo possível, executar movimentos lentos e controlados, evitando turbulência, usar uniformes.

Os uniformes devem ser compostos de: macacão impermeável, touca, máscara, luvas cirúrgicas e sapatilhas, estéreis. Devem ser de modelo simples e de material com baixa liberação de partículas.

• Materiais e equipamentos

- a. Equipamento de filtração por membrana, composto de:
 - frasco Kitasato;
 - suporte de aço inoxidável (manifould);
 - sistema de filtração;
 - mangueiras de silicone;
 - membranas de acetato de celulose de $0,45 \pm 0,02\mu\text{m}$ de porosidade de 47 mm de diâmetro;
 - pré-filtros em microfibras de vidro de 47 mm de diâmetro;
- b. Tesouras, pinças, seringas e agulhas;
- c. Estante para tubos de ensaio;
- d. Compressas de gaze embrulhadas em papel crepado.
- e. Recipientes de paredes rígidas para depósito de frascos ou ampolas quebradas e agulhas;
- f. Capela de fluxo laminar;

- g. Cabine de segurança biológica;
- h. Bomba de vácuo;
- i. Estufas bacteriológicas a 30-35°C e 20-25°C;
- j. Carrinho para transporte dos materiais utilizados no ensaio.

• Meios de cultura

- Flúido Tioglicolato;
- Caldo de Caseína soja;
- Potato Dextrose Agar;
- Plate Count Agar;
- Ágar sangue;
- Ágar eosina azul de metileno.

• Soluções e diluentes

- Água destilada esterilizada;
- Solução salina fisiológica estéril;
- Água peptonada 0,1%;
- Kit de Coloração de Gram;
- Álcool etílico 70%;
- Penicilinase.

5.1 Controle da esterilidade dos meios de cultura

Devem ser amostrados 10% de cada lote de flúido tioglicolato, caldo caseína de soja, água peptonada e solução salina produzidos, para comprovação da esterilidade. Essas amostras são incubadas nas mesmas condições de temperatura do ensaio por 14 dias.

Para a solução salina e água peptonada o controle é feito através do ensaio de esterilidade filtração por membrana, incubando nas mesmas condições dos ensaios de esterilidade.

5.2 Teste de promoção de crescimento dos meios de cultura

Cada lote de meio preparado deve ser testado quanto à promoção de crescimento. Inocular nos tubos dos meios de cultura em duplicata 1 mL da suspensão de cada microrganismo listado na TABELA 1 contendo menos que 100 células viáveis. Os meios testados são satisfatórias se for evidenciado visualmente crescimento em todos os tubos de meios inoculados com até 7 dias de incubação. Este teste pode ser conduzido simultaneamente com o ensaio de esterilidade. O ensaio de esterilidade é considerado inválido se a esterilidade do meio ou sua promoção de crescimento não for satisfatória.

5.3 Procedimento de limpeza das áreas assépticas

Deve ser elaborado um plano semanal de limpeza, desinfecção e descontaminação das áreas limpas (câmaras assépticas, fluxo laminar, etc.), este plano deve estar relacionado aos controles diários ou semanais do ambiente e superfícies.

5.4 Procedimentos para descontaminação da superfície externa do material teste

Para amostras acondicionadas em embalagens de vidro ou plástico: colocar as amostras mergulhadas em recipientes contendo álcool a 70% (ou outro desinfetante de escolha do laboratório) por no mínimo 30 minutos e no máximo duas horas, em seguida transferir para o fluxo laminar.

Para amostras acondicionadas em embalagens plásticas ou papéis (equipos, seringas):

borrifar as amostras com álcool 70% (ou outro desinfetante de escolha do laboratório) e transferir imediatamente para dentro do fluxo previamente descontaminado, deixar em exposição à luz ultravioleta por aproximadamente 20 minutos.

5.5 Superfície dos materiais utilizados no ensaio

Nos materiais acondicionados internamente com papel alumínio e externamente com papel crepado, retirar cuidadosamente o papel crepado externo evitando tocar a outra folha de papel crepado.

Ordenar o material na capela de fluxo laminar e descontaminar pela exposição do mesmo à U.V. por 10 a 15 minutos.

5.6 Amostragem

Preferencialmente analisar no mínimo 20 unidades de material. Nos casos de metodologia por inoculação direta e amostras líquidas com menos de 5 mL, sólidos no qual o diluente seja inferior a 5 mL, seringas, agulhas e escalpes serão necessárias 40 unidades.

Quando não houver disponibilidade da quantidade de amostras, o ensaio poderá ser realizado, mas no resultado deve constar que o ensaio se aplica ao número de amostras testadas e não ao lote todo.

5.7 Atividade bacterostática e fungistática do material analisado

Deve-se verificar antes do início do teste se o material a ser analisado possui atividade inibitória de crescimento fúngico ou bacteriano inerente ao artigo, efeito adverso para a confiança do teste. Se houver algum efeito, ajustar o procedimento. Prepare culturas diluídas dos microrganismos listados na TABELA 1 para obter uma concentração final de menos de 100 UFC por mL de células viáveis.

Filtre a quantidade especificada da amostra teste. Ao final do ensaio de esterilidade, retirar um volume da rinsagem final (filtrado), inocular a rinsagem nos tubos de fluido tioglicolato e caldo caseína de soja com os microrganismos (menos que 100 UFC), especificados na TABELA 1 e incubar os tubos com o meio, na temperatura de 35°C e 25°C, respectivamente, por não mais que 7 dias.

5.8 Interpretação

Se o crescimento de cada microrganismo teste no tubo é visualmente comparável ao crescimento no controle positivo o material usado não é bacteriostático ou fungistático. Se o crescimento do organismo teste nos tubos não é visualmente comparável com o controle positivo, a quantidade do material usado é bacteriostático ou fungistático.

Tabela 1 - Microrganismos teste usados para teste de promoção de crescimento e para validação dos testes bacteriostáticos e fungistáticos. Incubação 7 dias

Meio de cultura	Microrganismo	Cepa	Temperatura	Condições
Fluido tioglicolato	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC ¹ 6538	32.5 ± 2.5 °	aeróbico
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	32.5 ± 2.5 °	aeróbico
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	32.5 ± 2.5 °	aeróbico
	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC ² 11437	32.5 ± 2.5 °	aeróbico
Caldo caseína soja	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 1147	32.5 ± 2.5 °	anaeróbico
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	22.5 ± 2.5 °	aeróbico
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC ¹ 6538	32.5 ± 2.5 °	aeróbico
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	32.5 ± 2.5 °	aeróbico

1. Uma alternativa para *Staphylococcus aureus* é *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

2. Um alternativo para *Clostridium sporogenes*, quando um microrganismo não formador de esporos é desejado, é *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482).

Fonte: UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2005.

O ensaio de esterilidade pode ser realizado por duas metodologias distintas, ambas

contempladas pela USP 29: filtração por membrana e inoculação direta.

A escolha da metodologia deve ser em função da natureza do material a ser ensaiado. Para injetáveis estéreis como antibióticos, hemoderivados, soluções parenterais e vacinas, o teste deve ser realizado pelo método filtração por membrana. Pelo método inoculação direta para: seringas, agulhas implantes, cateteres, equipos, gases, pinças, vestimentas cirúrgicas, panos de campo, frascos de coleta, tesouras e outros materiais estéreis.

Para antibióticos do grupo das penicilinas (Carbenicilina, Ticarcilina, Piperacilina) e das Cefalosporina (Cefazolina, Cefoxitina, Cefotaxima, Cefoperazona, Ceftriaxona e Ceftazidima) é necessário que se faça o enxágüe final da membrana com solução de penicilinase para a neutralização total do antibiótico.

Algumas amostras não podem ser filtradas porque entopem os poros da membrana, assim é necessário levantar dados com o fabricante ou na literatura para realizar o ensaio.

Quando não houver dados disponíveis ou houver dúvida sobre a metodologia adequada, utilizar-se-á preferencialmente a metodologia de filtração por membrana.

Quando houver turvação dos meios utilizados após inoculação da amostra, devido a natureza do material teste, dificultando a observação da ocorrência de crescimento microbiano, transferir no 7º dia do teste, porções de 1 mL para tubos contendo o mesmo meio, e incubar todos os tubos por mais 14 dias.

A verificação de presença de contaminantes deve ser feita através de passagens do meio de cultura turvo para meios de cultura sólidos (ágar eosina azul de metileno, ágar sangue, *Plate Count* ágar e Potato Dextrose ágar). Quando após a incubação destes meios, for confirmado o crescimento deverão ser feitos esfregaços em lâminas e coloração através do método de Gram para a identificação das características morfológicas e tintoriais dos microrganismos.

• Identificação dos tubos de meios de cultura

1. Nome do meio de cultura;
2. Identificação da amostra teste;
3. Lote do meio de cultura

5.9 Controle ambiental durante o ensaio

Fazer o controle microbiológico do ambiente e da câmara de fluxo laminar, a cada material ensaiado, expor placas de Petri, contendo *Plate Count* Agar e Potato Dextrose Agar, uma placa para cada meio. Incubar as placas a $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ e $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ durante 48 horas e cinco dias respectivamente.

6 MÉTODO DE FILTRAÇÃO POR MEMBRANA

Procedimentos:

Adaptar o funil de filtração ao suporte de aço inoxidável e este ao frasco de kitasato ou o funil diretamente no kitasato ou ainda, usar o sistema filtro. Conectar todo o sistema à bomba de vácuo.

Para amostras líquidas transferir 5 mL ou o conteúdo todo do frasco quando o volume for inferior a 5 mL com auxílio de seringa e agulha, para o funil de filtração.

No caso de amostras liofilizadas, reconstituir o líofilo utilizando o diluente, conforme a orientação do fabricante e transferir 5 mL ou o conteúdo total do frasco quando o volume for inferior a 5 mL com auxílio de seringa e agulha, para o funil de filtração. Verter a amostra no funil de filtração e filtrar a vácuo.

Após a filtração, fazer a rinsagem da membrana com no mínimo 100 mL de água peptonada a 0,1%. Algumas amostras possuem propriedades inibitórias de crescimento, então poderão ser enxaguadas com até 5 porções de 500 mL de água peptonada.

Separar as duas partes do equipamento de filtração e com auxílio de pinça e tesoura estéreis, segurar e cortar a membrana em duas partes aproximadamente iguais. Introduzir cada metade da membrana nos tubos de ensaio contendo 100 mL dos meios fluido Tioglicolato e caldo caseína soja devidamente identificados. Incubar por 14 dias, fazendo observações diárias quando ao aparecimento de turvação.

7 MÉTODO DE INOCULAÇÃO DIRETA

Este método consiste na transferência asséptica do material teste para os meios tioglicolato fluído e caseína soja seguida de incubação a 30-35° C e 20-25° C, respectivamente, e incubados durante 14 dias.

Seringas: usar 40 unidades do material teste, fazer o enxágüe de cada seringa com o próprio meio e voltar o meio para o tubo. Ao transferir a seringa diretamente nos meio de cultura, usar uma quantidade de meio suficiente para encobrir a seringa.

Agulhas: usar 40 unidades, retirar a agulha assepticamente da embalagem, retirar a capa da agulha com auxílio de pinça estéril e colocar diretamente nos meios.

Implantes: usar 40 unidades, retirar o implante assepticamente da embalagem com auxílio de pinça estéril e colocar diretamente nos meios.

Cateteres e equipos: passar aproximadamente 10 mL de solução salina estéril pelo lúmen de cada equipo ou catéter transferindo 5 mL para o meio tioglicolato fluído e 5 mL para o meio caseína soja.

Escalpes: usar 40 unidades, passar aproximadamente 5 mL de solução salina estéril pelo lúmen de cada escalpe e transferir diretamente para o meio.

Gaze, algodão purificado, vestimentas cirúrgicas, pano de campo, etc: de cada embalagem de material a ser analisado retirar com auxílio de pinça, duas porções de 100 a 500 mg das partes mais internas da amostras. Para materiais em embalagens individuais, tais como chumaço de gaze, retirar duas porções individuais de 250 a 500 mg, ou duas unidades totais, no caso de unidades pequenas.

Aparelhos parenterais: para aparelhos de formas e dimensões que permitam sua imersão total em não mais que 1000 mL de meio de cultura, testar o aparelho intacto, mergulhando uma unidade nos meios. Verificar se os canais e orifícios estão em contato com o meio de cultura; caso isto não ocorra, fazer cortes no aparelho para atingir tal objetivo.

Frascos de coleta: fazer o enxágüe do material com o próprio meio, e devolver o meio no tubo.

Pinças, tesouras, cânulas, etc: mergulhar o material por completo no meio.

Seringas pré-enchidas: transferir 5 mL do conteúdo de uma seringa para cada um dos meios.

Amostras líquidas ou sólidas dissolvidas com volume menor que 5 mL: Transferir o conteúdo total da amostra diretamente aos meios.

Amostras líquidas ou sólidos dissolvidos com 5 mL ou mais: usar 20 unidades, transferir no mínimo 2,5 mL e no máximo 5 mL para cada meio.

No caso de materiais sólidos deve ser considerado se o material está inteiramente estéril, ou apenas parte do mesmo, como seu interior.

Baseando-se no tamanho do material e da sua complexidade, o mesmo pode ser colocado dentro dos meios de cultura, inteiro ou cortado, enxaguado com o próprio meio de cultura ou com soro fisiológico, neste caso, os líquidos de lavagem é que deverão ser inoculados nos meios de cultura.

8 VALIDAÇÃO DO ESTUDO

O estudo é considerado válido quando não houver crescimento microbiano nas placas de meios de cultura utilizadas no controle da capela de fluxo laminar durante a realização do teste, nos meios não inoculados (branco), nas soluções e diluentes usadas, e nos materiais usados para transferência do material teste para o meio de cultura.

O estudo deve ser invalidado quando houver crescimento simultâneo em qualquer um dos meios de cultura inoculados com o material teste, e em qualquer um dos controles (capela de fluxo laminar, meios ou materiais usados durante o ensaio).

Neste caso, repetir o ensaio com a mesma amostragem.

9 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

O material atende às exigências do “Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica” quando não houver crescimento microbiano em nenhum dos meios de cultura.

No caso dos materiais apresentarem crescimento microbiano, realizar o reteste com o dobro de amostra e interpretar o ensaio conforme o esquema abaixo:

Teste	Reteste	Resultado
-	X	Atende às exigências do ensaio.
+	-	Atende às exigências do ensaio.
+	+	Não atende às exigências do ensaio.

X = não realizado

- = sem crescimento

+ = com crescimento

Conclusões e recomendações

O teste de esterilidade é destinado a revelar a presença de microrganismos nas amostras utilizadas no teste. A interpretação dos resultados é baseada na suposição de que o conteúdo de cada recipiente do lote, se testados, também teriam resultado equivalente (INCQS, 1984).

A extensão do resultado ao restante do lote requer a segurança de que todas as unidades do mesmo tenham sido preparadas de modo a garantir grande probabilidade de que todo o lote passaria pelo teste (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Não se deve esquecer que a presença de microrganismos mesmo que não sejam patogênicos pode alterar completamente a composição do produto biológico, tendo em vista que esses microrganismos crescem às custas, em muitos casos, de degradação de proteínas, peptídeos e açúcares presentes como componentes antigênicos de vacina ou soro. Por outro lado, é importante lembrar ainda que os critérios de patogenicidade são bastante relativos, variáveis e imprecisos e que sobretudo dependem do estado imunológico do indivíduo. Portanto, qualquer que seja o tipo e o nível da contaminação do produto é importante que se use as técnicas mais aprimoradas possíveis para a sua detecção (INCQS, 1984).

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n. 500, de 09 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Soluções Parenterais de Grande Volume - SPGV e seus Anexos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 out. 1997. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18992&word>>. Acesso em: 26 set. 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 46, de 18 de maio de 2000. Normatiza os processos de produção e Controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados para uso humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 maio 2000. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=496&word>>. Acesso em: 18 set. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14041**: Equipo de infusão estéril e de uso único. Rio de Janeiro: ABNT, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14168**: Equipo de transfusão para uso único. Rio de Janeiro: ABNT, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISSO 7886-1**: Seringa hipodérmica estéril para uso único - Parte 1: seringa para uso manual. Rio de Janeiro: ABNT, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISSO 8537**: Seringas estéreis de uso único, com ou sem agulhas, para insulina. Rio de Janeiro: ABNT, 2006.

CARVALHO, K. C. N. **A esterilização**. Disponível em: <www.saudebrasilnet.com.br/premios/saude/premio4/trabalhos/003.pdf>. Acesso em: 18 set. 2007.

CIH HOEFEL. Esterilização. Disponível em: <<http://www.cih.com.br/>>. Acesso em: 18 set. 2007.

ERWIN GUTH. **Quais são os métodos de esterilização mais usados?** Disponível em: <<http://www.erwinguth.com.br/html/cig5.php#lauril>>. Acesso em: 18 set. 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3. ed. 1988.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica**. Disponível em: <<http://www.uma.pt/gcosta/docs/microbiology/prat1.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Teste de esterilidade de produtos biológicos**. Rio de Janeiro: INCQS, 1984.

LEME, M.T.C. L. **Flasches em controle de infecção**. S.l.: Relisul, 1990.

LIMA, Luís Felipe Moreira *et al.* **Vigilância sanitária de medicamentos e correlatos**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 950, de 26 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 nov. 1998. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=697&word>>. Acesso em: 17 set. 2007.

TORTORA, Gerard J; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPEIA – USP. 29. ed. 2005.

Anexos

Anexo - Fotos do ensaio de esterilidade pelo método inoculação direta



Figura 1 - Passagem dos meios de cultura pela descontaminação de superfície
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 2 - Retirada dos meios de cultura para transferência para cabine de fluxo laminar
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 3 - Amostras testes
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 4 - Placas para amostragem de ar durante o teste
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.

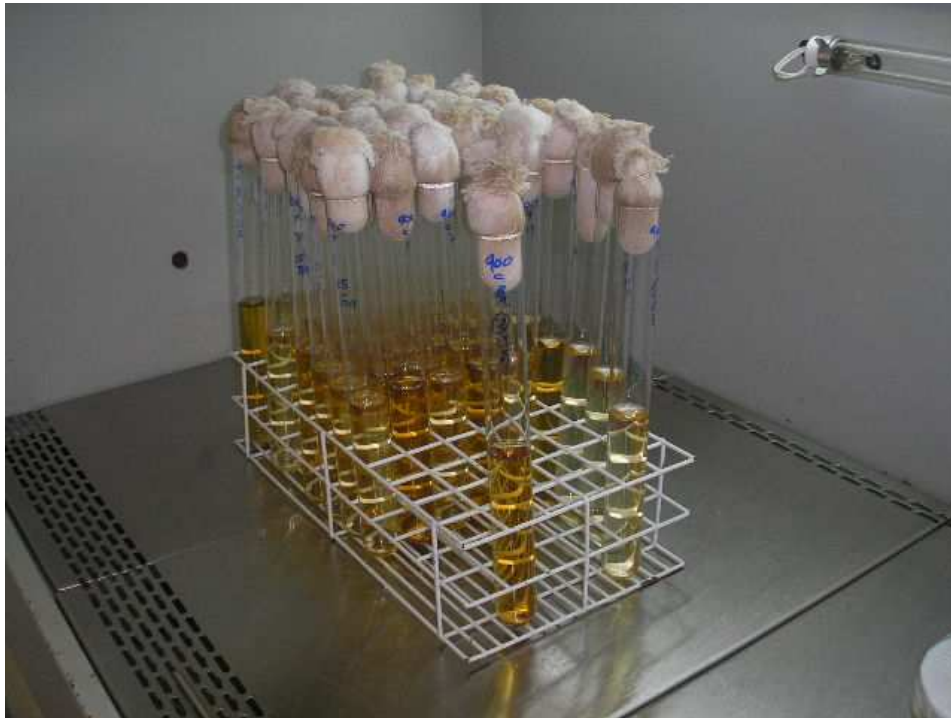


Figura 5 - Meios de cultura para realização do teste
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 6 – Realização do teste
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 7 - Colocação da amostra teste dentro dos tubos com meio de cultura
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.

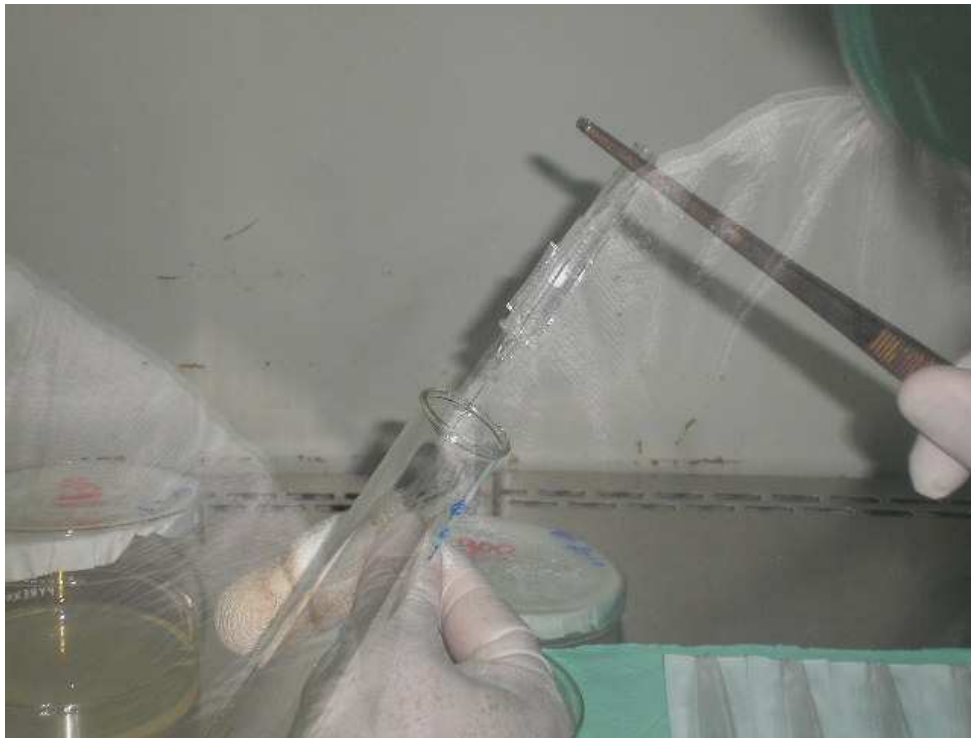


Figura 8 - Colocação da amostra teste dentro dos tubos com meio de cultura
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 9 - Abertura da embalagem da seringa teste
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 10 - Teste de esterilidade de seringas por enxágüe nos meios de cultura
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 11 - Enxágüe da seringa no meio de cultura
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 12 - Estufa de incubação
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 13 - Meio de cultura caldo caseína em estufa de 25°C
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.

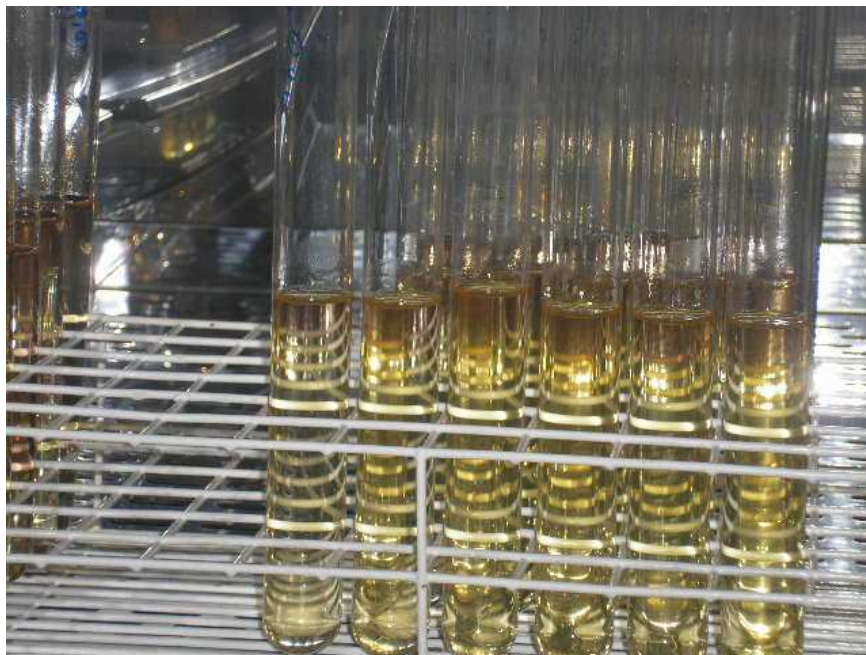


Figura 14 - Meio de cultura Fluido tioglicolato em estufa de 35°C
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.



Figura 15 - Autoclave para descontaminação de meios de cultura com amostras positivas
Fonte: HIGASKINO; FIGEL, 2007.

Nome do técnico responsável

Carmen Etsuko Kataoka Higaskino
Izabel Cristina Figel
Maria Paula Assis Yamada

Nome da Instituição do SBRT responsável

Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR

Data de finalização

10 out. 2007