

*plastlabor*

10





*plastlabor*

10

# VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE MONITORAMENTO AMBIENTAL

Rodrigo Oliveira

# FACILITADOR

Farmacêutico e Bioquímico, Pós Graduação em Microbiologia.  
Experiência (14 anos) em Industria Farmacêutica nas áreas de Microbiologia e  
Processamento Asséptico.  
Palestrante

The logo for Chiesi, featuring a stylized blue 'C' icon followed by the word 'Chiesi' in a blue sans-serif font.The logo for Organon, consisting of the word 'Organon' in a blue serif font enclosed within a blue oval border.The logo for Chiesi, featuring a stylized blue 'C' icon followed by the word 'Chiesi' in a blue sans-serif font.The logo for Sanofi, featuring a stylized blue and green 'S' icon followed by the word 'SANOFI' in a blue sans-serif font.The logo for Novartis, featuring a stylized orange and blue 'N' icon followed by the word 'NOVARTIS' in a blue sans-serif font.The logo for Aché, featuring the word 'achē' in a pink sans-serif font.The logo for plastlabor 10, featuring the word 'plastlabor' in a purple sans-serif font followed by a large purple '10'.

# DEFINIÇÃO

O Programa de Monitoramento Ambiental destina-se a avaliar a conformidade de partículas viáveis e não viáveis do ambiente de manufatura usando uma combinação de diferentes métodos de amostragem.



# FINALIDADE

- Garantir que não há risco de contaminação do produto proveniente do ambiente.
- O programa de monitoramento ambiental visa a detecção da condição microbiológica da área, sendo amostrados os pontos críticos ao processo do produto.
- Monitorar o ar, superfície e operadores envolvidos de forma direta ou indireta na produção, controle e envase de produtos.

# MONITORAMENTO AMBIENTAL





# CONSIDERAÇÕES DO TESTE

- Amostras microbiológicas não devem nunca ser armazenadas em estado de congelamento antes da realização dos testes já que essa prática pode levar à perda de viabilidade celular.
- Devem ser documentados e rastreados o horário de amostragem e as condições de transporte e armazenamento das amostras antes de se iniciarem os testes.
- As amostras de monitoramento ambiental como Ar Viáveis, plaqueamento, superfícies e de pessoal devem ser incubadas o mais rápido possível após a amostragem.
- Se, devido a motivos organizacionais, o transporte e incubação imediatos das amostras não são possíveis, o tempo máximo de retenção sob circunstâncias controladas deve ser definido baseando-se em propósitos organizacionais.

# CONSIDERAÇÕES DO TESTE

- As amostras devem ser retidas pelo menor tempo possível e posteriormente validadas com estudos experimentais. Por exemplo, um tempo de retenção de amostra de 5 dias é aceitável se validado.
- Não espera-se que a quantia de UFC's originalmente localizadas nas placas após a amostragem do ambiente mude após certo tempo. Entretanto, a capacidade desses microorganismos de crescer e multiplicar (fase lag/log) até apresentarem detecção visual das colônias pode ser impactada se as amostras não são incubadas imediatamente e em temperaturas ideais.
- Como por exemplo, placas podem secar e haver diminuição das propriedades promotoras de crescimento se armazenadas por muito tempo sob condições extremas.



# CONSIDERAÇÕES DO TESTE

- **Não é permitido** de forma alguma o **armazenamento** de amostras do monitoramento ambiental em **temperaturas entre 2 a 8°C**, já que a fase lag de alguns microorganismos se estenderia, resultando em contagens de colônias menor que as esperadas após o tempo de incubação definido.
- Deve ser validado com estudos experimentais para demonstrar que o crescimento microbiano não é comprometido pelo tempo de retenção estendido das amostras antes da incubação.

# PROTOCOLO

- A embalagem de placas do monitoramento ambiental em sacos permeáveis ( por exemplo, reduzir o risco de contaminação secundária) deve fazer parte da validação.
- O estudo deve demonstrar que, para diferentes tipos de placas do monitoramento ambiental testadas, propriedades de promoção de crescimento são comparáveis, independentemente de terem sido retidas por um tempo (e embaladas) ou imediatamente incubadas (e desembaladas).
- Testar todos os tipos de material de amostra do monitoramento ambiental usados (por exemplo, placas de Petri de 90mm, placas de contato, meios TSA ou SDA, etc.).



# PROTOCOLO

- Usar número adequado de réplicas (por exemplo, testes de hipóteses, como T-tests são usados, pelo menos 6 réplicas por condição testada devem ser incluídas). Para testes que não são aplicadas as condições estatísticas fazer em duplicata.
- Usar pelo menos mais de um lote de meio de cultura na validação para cobrir a variabilidade entre os lotes dos meios.
- Microorganismos testados são **Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Aspergillus brasiliensis, Candida albicans e Flora local.**

# PROTOCOLO

- - Inocule o meio com menos de 100 UFC de microorganismos teste usando, por exemplo, o método de espalhamento em placa. Devem ser tomados cuidados durante os estudos para que as placass ressecadas não sejam reidratadas com o volume de inóculo adicionado. Para isso, é recomendado que o volume utilizado seja no máximo de 100µl.
- - Depois da inoculação, incube imediatamente as **placas de controle** nas condições de incubação definidas de monitoramento ambiental.
- As **placas de teste** inoculadas são primeiramente embaladas (se incluído no procedimento), armazenadas durante o período de retenção definido e sob as mesmas condições de retenção usadas na rotina do monitoramento ambiental. Elas então são incubadas nas mesmas condições definidas pelo monitoramento ambiental.



# Amostragem Ativa do Ar



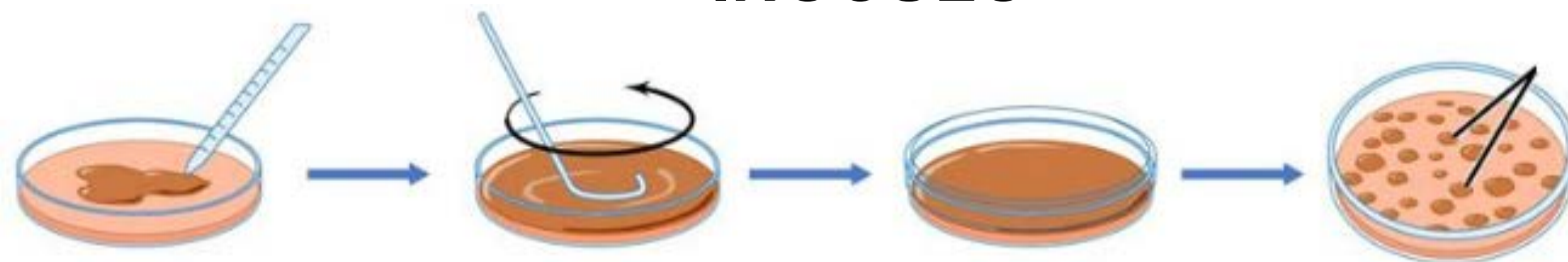
**PLACA 90X15**



**AMOSTRAGEM 1000L\***

**AMOSTRAGEM  
FRACIONADA DE 1000L\***

**INÓCULO**



**EMBALAGEM E PARAFILM**

**TEMPO DE RETENÇÃO**



plastlabor



**\*AMOSTRAGEM EM GRAU A**



# Exposição De Placa

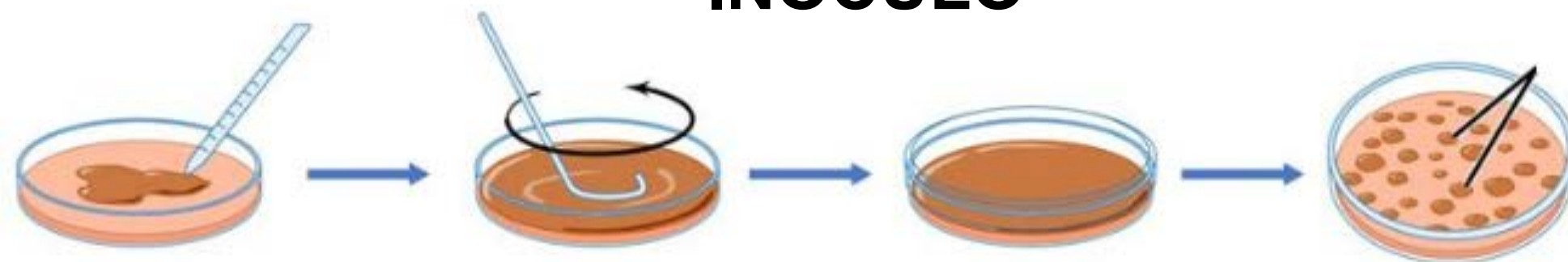
**PLACA 90X15**



**AMOSTRAGEM SOB FLUXO**

**ALTURA DE ESCOLHA MAIS CRITICA\***

**INÓCULO**



**EMBALAGEM E PARAFILM**

**TEMPO DE RETENÇÃO**



**\*ESCOTILHA DO TANQUE DE MANIPULAÇÃO**



# Superfície

**INÓCULO**



**SUPERFÍCIE ESTÉRIL**



**CUIDADO COM O TIPO DE MEIO DE ESCOLHA NA ROTINA**

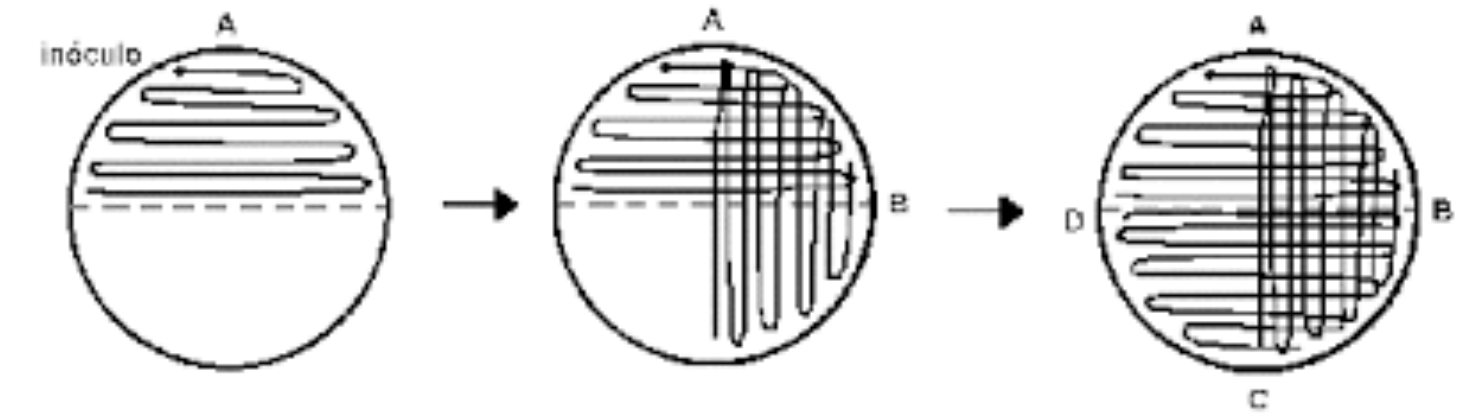
**EMBALAGEM E PARAFILM**

**TEMPO DE RETENÇÃO**





**INÓCULO**



**ESTRIAMENTO EM PLACA**

**TEMPO DE RETENÇÃO**

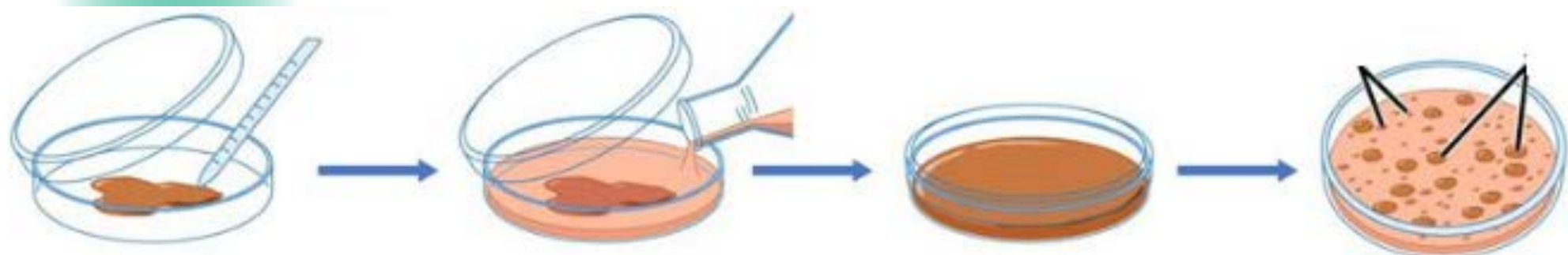
**SUPERFÍCIE ESTÉRIL  
5CM X 5 CM**



**FILTRAÇÃO**



**MÉTODO DE POUR PLATE**



# Controles



# CONTROLES

- **Controle Positivo:**
- Para o Controle Positivo, utilizar placas que não sofreram nenhum processo de amostragem. Inocular com a mesma quantidade utilizada no grupo teste, em duplicata, para cada microorganismo.
- **Controle Negativo:**
- - Para cada lote de placa, realizar a amostragem conforme o grupo teste, sem a adição de inóculos.

# Avaliação



# AValiação

- - Após a incubação, os microorganismos são enumerados em ambas as placas de controle e teste.
- - Como requisito mínimo, não devem haver desvios (50-200% de recuperação) na taxa média de recuperação das placas de teste comparadas às placas de controle, conforme USP <61>.
- - Por exemplo, para ar viáveis, em placas de Petri controle de 90mm contendo E. Coli, a contagem média de controle é 90 UFC e das placas de teste é 70 UFC, assim, uma recuperação adequada de 78% é alcançada.
- - Se réplicas suficientes estiveram disponíveis, métodos estatísticos adicionais podem ser usados para avaliar a informação como por exemplo em testes de hipóteses estatísticas (exemplo, T-testes) ou testes de não inferioridade com limite não inferior a 50% e superior a 200%.

# AVALIAÇÃO

- O estudo está considerado validado se os resultados obtidos atenderem aos seguintes critérios de aceitação:
  - - As placas do grupo teste devem apresentar recuperação de 50% a 200% para todos os microorganismos;
  - Os controles positivos devem apresentar contagem inferior a 100UFC;
  - Os controles negativos não devem apresentar crescimento microbiano;



# Variáveis

# CAUSAS DE FALHAS NOS TESTES

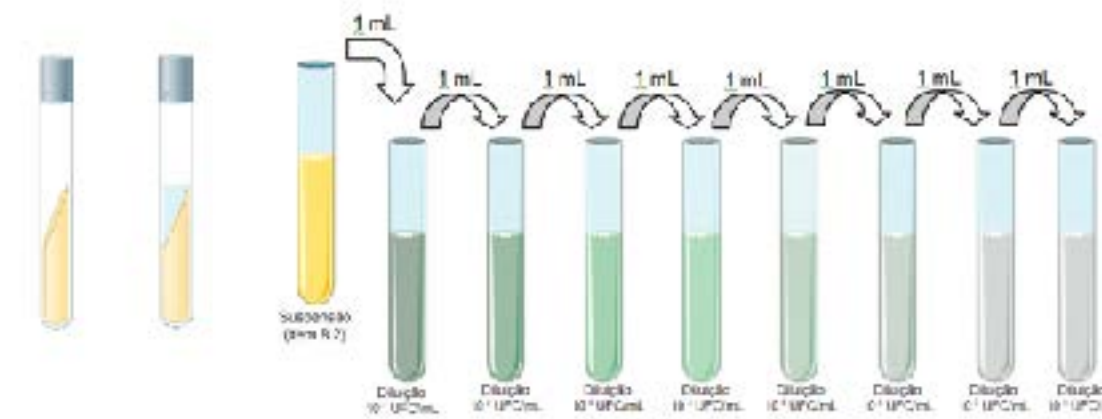
<b>Geral</b>	<b>Uso de método inadequados</b>
	<b>Planejamento inadequado</b>
	<b>Tempo de retenção prologado</b>
	<b>Temperatura de armazenamento inadequada</b>
<b>Inóculo</b>	<b>Baixa viabilidade de suspensões de inóculo</b>
	<b>Método de quantificação não validado</b>
	<b>Suspensões de esporos fúngicos e bacterianos preparadas incorretamente</b>
<b>Superfície</b>	<b>Superfícies porosas</b>
	<b>Coupons não passíveis de esterilização a vapor</b>
	<b>Inoculação ou cobertura irregular</b>
<b>Recuperação</b>	<b>Letalidade após secagem ( por exemplo, P. Aeruginosa</b>
	<b>Placas com meio de cultura ressecado</b>
	<b>Placas com quantidade insuficiente de meio de cultura</b>



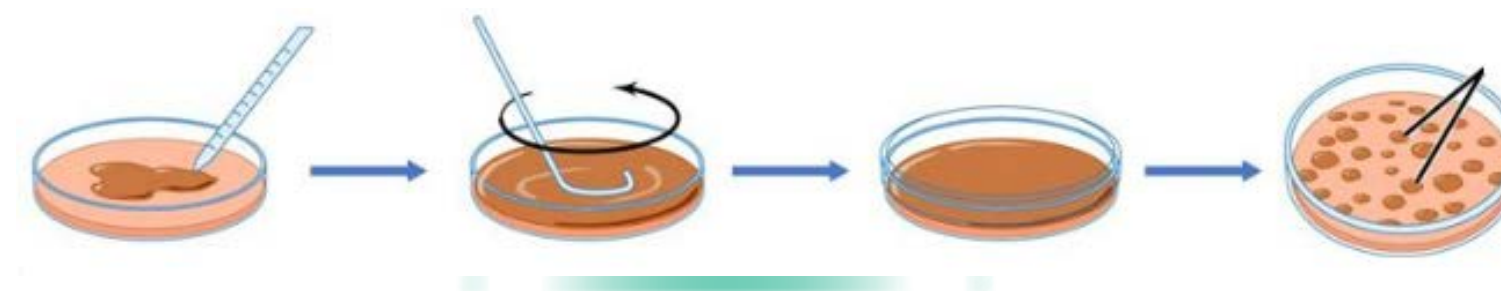
# QUANTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO

1º - As bactérias devem ser repicadas de 18 a 24 horas de antecedência, já os fungos de 2 a 7 dias.

2º - Realizar o preparo da solução mãe ( espectrofotometro) e diluição seriada.



3º - Método de Spread plate em duplicata para as diluições de acordo com Bactérias ou fungos



4º - Incubação de bactérias 30-35°C pelo período de 18-24 horas e os fungos 30-35 °C pelo período de 24-48 horas.

5º - Eleger a diluição que possui crescimento médio entre 20 e 100 colônias por placa .



**9 DIAS DE  
PREPARO**

# EXEMPLO OTIMIZAÇÃO DO TESTE

## CONTROLE QUANTITATIVO DA POPULAÇÃO DO INÓCULO

### **Microrganismos Epower™ - Microbiologics®**

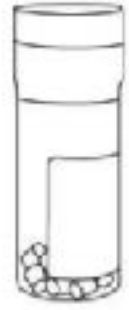
São preparações de microrganismos liofilizadas e quantitativas para serem utilizadas em laboratórios industriais para fins de controle de qualidade. Um único microrganismo Epower pode ser utilizado como inoculação individual ou diversas espécies podem ser combinadas e utilizadas na inoculação de populações mistas.

Essas preparações de micro-organismos são rastreáveis na Coleção Americana de Tipos de Cultura (American Type Culture Collection, ATCC®) ou outra referência autêntica de coleção de cultura.



# EXEMPLO OTIMIZAÇÃO DO TESTE

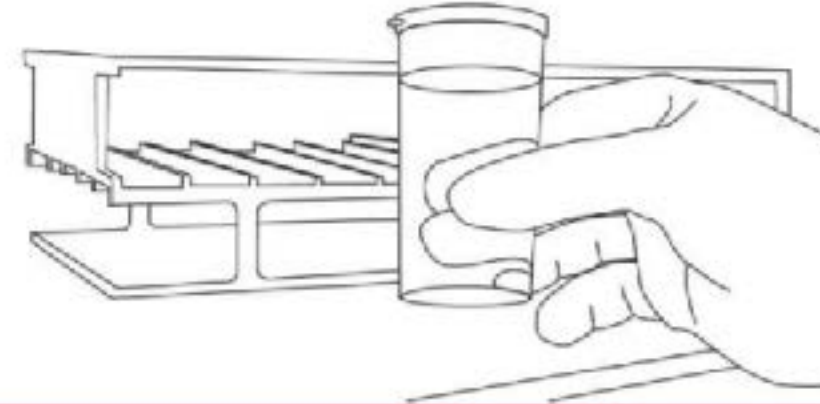
1



Remova o frasco de pílulas do armazenamento refrigerado e deixe-o se equilibrar com a temperatura ambiente.

2

Antes da utilização, aqueça os fluidos de diluição e hidratação a 34°C – 38°C. Recomenda-se um tampão fosfato estéril com pH 7,2 para a hidratação da preparação liofilizada.



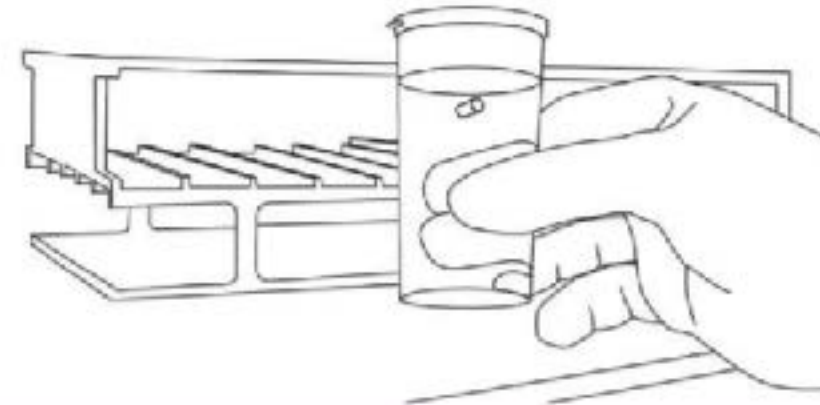
3



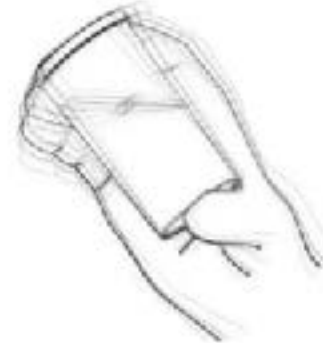
Com um fórceps estéril, transfira a(s) pílula(s) de micro-organismos Epower™ para o fluido hidratante. Não remova o dessecante do frasco. Recoloque a rolha e a tampa no frasco imediatamente e retorne à temperatura de 2°C – 8°C.

4

Coloque a suspensão de micro-organismos em uma incubadora de 34°C – 38°C por 30 minutos para garantir uma hidratação completa.



5



Imediatamente após a incubação, misture o material hidratado até obter uma suspensão homogênea.

6

Prossiga com a inoculação de acordo com o protocolo do laboratório. A inoculação deve ser completa em até 30 minutos do processo de hidratação para evitar uma alteração na concentração da suspensão de inoculação.



# EXEMPLO OTIMIZAÇÃO DO TESTE

Os microrganismos Epower estão disponíveis em uma variedade de concentrações de inoculação

Concentração da pílula	Exemplos de concentração (CFU/ml) no volume de fluido hidratante especificado		
	1 ml	10 ml	100 ml
E2	100 – 999	10 – 99	1 – 9
E3	1000 – 9999	100 – 999	10 – 99
E4	10.000 – 99.999	1000 – 9999	100 – 999
E6	1.000.000 – 9.999.999	100.000 – 999.999	10.000 – 99.999
E7	10.000.000 – 99.999.999	1.000.000 – 9.999.999	100.000 – 999.999
E8	100.000.000 – 999.999.999	10.000.000 – 99.999.999	1.000.000 – 9.999.999

# PONTOS DE ATENÇÃO

- Espessura do Plástico utilizado;
- Temperatura dentro da embalagem;
- Relatório incluir certificados de análise de meios, reagents e equipamentos;
- Testes de Promoção de Crescimento;

# BIBLIOGRAFIA

- Code of Federal Regulations 21 CFR 610.12 Sterility
- Ph. Eur. Current Edition, Chapter 2.6.1. Sterility
- USP Current Edition, Chapter <61> Microbiological examination of nonsterile products: microbial enumeration tests USP Current Edition Chapter Sterility tests
- USP Current edition chapter< 1211> Sterilization and sterility assurance of compendial
- USP current edition chapter < 1231> Water for Pharmaceutical Purposes
- EU 2008 Guidelines to Good Manufacturing Practice Medical Products for Human and Veterinary Use Annex I: Manufacture of Sterile Medicinal Products



# BIBLIOGRAFIA

- ANVISA, IN 35 - Boas Práticas de Fabricação complementares a Medicamentos Estéreis, 2019.
- PIC/S, PI 012-3 Recommendation on Sterility Testing
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, American Public Health Association, Washington, DC 2005
- PDA Technical Report 69 (2015). Bioburden and biofilm management in pharmaceutical manufacturing operations
- FDA 2004 Guidance for Industry - Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice
- FDA 2012 Guidance for Industry-Pyrogen and Endotoxins Testing: Questions and Answers

*plastlabor*

10

**Obrigado**