

Controle de Carga Microbiana em Salas Limpas - Avaliação do uso de

Petrifilm™ – 3M para controle de superfícies e operadores

Siomara Christina Veronezi Curtale*

Introdução

A preparação asséptica de produtos farmacêuticos, especialmente destinados à nutrição parenteral e produtos estéreis em geral (colírios, soros e imunoterapia) pressupõe a manipulação dos princípios ativos em áreas controladas, comumente denominadas “Salas Limpas”. Além destes ambientes especiais, o uso de material e instrumentos esterilizados, matérias primas qualificadas e pré-esterilizadas, manipuladores treinados e paramentados adequadamente, o extremo rigor na garantia das condições ambientais durante a preparação e envase destes produtos é prática obrigatória.

Esta condição especial de fabricação está presente não somente nas indústrias farmacêuticas, mas também em farmácias de manipulação que se enquadram no grupo IV – manipulação de estéreis, segundo a nova RDC 214 (ANVISA, 12/12/06).

Nas farmácias de manipulação de estéreis, as Salas Limpas classe 100 instaladas dentro de ambientes classe 1000, garantem a manipulação segura do medicamento graças ao sistema de constante renovação e filtragem do ar, diferencial de pressão nas portas, manipulação sob fluxos laminares, uso de paramentos adequados completos e estéreis (calças, bata, capuz, luvas, botas e máscaras) e rigoroso monitoramento periódico da carga microbiana do ambiente através de amostragem do ar interior, de superfícies em contato direto com o produto e de manipuladores (mãos e uniformes).

Este controle rigoroso assegura as Boas Práticas de Manipulação e confere segurança ao processo de manipulação e por consequência ao medicamento preparado.

O controle da carga microbiana é feito por uma ou mais técnicas abaixo:

- Amostrando-se ar ambiental por meio de amostradores de ar (técnica de impactação),
- Exposição de placas de petri com ágar padrão (técnica de sedimentação)
- Amostragem da superfície de pontos críticos através de aplicação direta de placas especiais com ágar padrão posicionadas em locais estratégicos (técnica de contato ou RODAC)
- Inoculando-se em placas ou caldos padrão material coletado do ambiente com swabs.

A somatória dos resultados obtidos destas diferentes estratégias de monitoramento deve assegurar que a carga microbiana total esteja dentro das especificações preconizadas para cada ambiente classificado, especificações bem definidas em compêndios farmacopéicos.

Considerando-se a crescente busca por otimização de rotinas, minimizando ao máximo as rotinas preparatórias para as análises microbiológicas em geral, métodos que garantam a eficácia do monitoramento microbiológico de forma prática e eficiente, envolvendo o mínimo possível de preparação e manuseio são sempre desejáveis.

Este panorama aponta para a utilização de meios de cultura industrializados e prontos para uso, já plaqueados, com longa validade e qualidade garantida.

Petrifilm™ é uma moderna alternativa para análises microbiológicas desenvolvida pela 3M e mundialmente utilizada para a enumeração geral ou específica de microorganismos. Graças ao seu design, é considerado um sistema pronto para uso.

Entre as características mais marcantes do Petrifilm™ destaca-se o uso de meios de cultura farmacopéicos padrões solúveis a frio, distribuídos e liofilizados em filmes plásticos, o que confere longo período de validade ao produto e permite a substituição de tubos e placas de petri e suas etapas convencionais de preparação, esterilização e plaqueamento do meio de cultura previamente

* **Bióloga pelo Mackenzie, especialização em microbiologia pelo Instituto Adolfo Lutz**

contato: sbcc@sbcc.com.br



ao uso. A incorporação de corantes indicadores e reveladores específicos para atividade microbiana ao meio de cultura facilita a leitura e interpretação dos resultados do Petrifilm™, permitindo inclusive documentar fotograficamente para arquivos futuros.

A proposta do Petrifilm™ é permitir recuperar e replicar microrganismos recuperados de ambientes, ar, soluções e suspensões em geral, fornecendo-se nutrientes e condições ideais para a formação e visualização das colônias, da mesma maneira que o método tradicional utilizando placas de petri.

Petrifilm™ se aplica às diversas rotinas de análise microbiológica, incluindo amostragem de superfícies, controle de higiene e limpeza, amostragem de ar por sedimentação ou associado à técnicas de coleta por swabs. Estas características sugeriram sua avaliação para controle de carga microbiana em Salas Limpas e ambientes controlados.

Objetivos

Verificar a viabilidade do uso de placas Petrifilm™ parâmetros Aeróbios Totais (Petrifilm™ – AC) e Bolores e Leveduras (Petrifilm™ YM) para monitoramento ambiental de superfícies e controle de higiene de operadores, comprovando que esta metodologia apresenta resultados tão confiáveis e eficazes quanto os apresentados pelo método tradicional de amostragem com placas de contato (RODAC).

Material e Métodos

Petrifilm™

As placas de Petrifilm™ são compostas por dois filmes:

a) Um filme superior em polipropileno, recoberto internamente com um adesivo que contém indicador e géis hidrossolúveis a frio. Este filme é permeável ao ar, fornecendo oxigenação suficiente durante a incubação.

b) Um filme inferior em papel quadriculado revestido por polietileno, recoberto por nutrientes e géis hidrossolúveis.

Previamente à amostragem de controle microbiológico ambiental, os Petrifilm™ necessários devem ser hidratados com 1 mL de diluente apropriado, neste estudo adotando-se o uso de Caldo Lethen para inativação de conservantes e agentes de sanitização utilizados na rotina de limpeza.

Aplica-se 1 mL do diluente no centro do filme inferior quadriculado, abaixa-se suavemente o filme superior evitando-se a retenção de bolhas de ar e aplica-se o difusor sobre o filme com uma leve pressão durante alguns segundos permitindo assim a difusão do líquido

em uma área delimitada de 30 cm² onde a geleificação do meio ocorrerá.

Este procedimento deve ser realizado pelo menos 1 hora antes da utilização, podendo os Petrifilm™ ser armazenados sob refrigeração por períodos de até 1 semana.

No momento da amostragem de superfícies e operadores a controlar, o filme superior deve ser levantado suavemente, aplicando-se o gel formado diretamente sobre a superfície ou luvas, uniformes dos operadores com uma leve pressão para favorecer o contato. Aguardar alguns segundos e retirar suavemente o filme, selando-o novamente e procedendo à incubação na temperatura ideal definida.

No presente estudo foram utilizados dois tipos de Petrifilm™, o modelo AC para contagem de aeróbios totais preparado com ágar padrão PCA (Petrifilm™-AC), e o modelo YM para contagem de bolores e leveduras preparado com ágar Sabouraud suplementado com antibióticos (Petrifilm™-YM). Para os dois modelos de Petrifilm™ adotou-se uma área de amostragem de 30 cm² e incubação a 35°C durante 48 hs.

Placas para contato (RODAC) com meio TSA

As placas para amostragem por contato foram adquiridas no mercado local, já prontas para uso no modelo RODAC (*Replicated Organisms Detection and Counting*) contendo meio de cultura TSA. A área de amostragem destas placas corresponde a 20 cm².

Microrganismos testes

Para o estudo foram utilizadas cepas de dois microrganismos desafio: *C.albicans* e *P.aeruginosa*.

Estes microrganismos foram cultivados no laboratório de controle de qualidade da Farmoterápica, e a partir de cultivos recentes foram preparadas suspensões microbianas contendo aproximadamente 100 células para desafiar os produtos e avaliar sua capacidade de recuperação tanto por inoculação direta (detecção de baixas concentrações de microrganismos) e indireta (% de recuperação de microrganismos inoculados em superfícies) através do contato com as placas e Petrifilm™.

Parâmetros avaliados

Teste Qualitativo – Sensibilidade de detecção de baixas cargas de microrganismos:

Foram avaliados um total de 30 placas de RODAC-TSA, 30 placas de Petrifilm™-AC e 30 de Petrifilm™-YM, divididas em grupos de 10 placas avaliadas simultaneamente em 3 dias diferentes. O controle das diluições

artigo técnico

desafio foi realizado semeando-se em profundidade as diluições de microrganismos em meio TSA para estabelecimento da concentração de células aplicada às placas nos diferentes dias de testes.

Com auxílio de uma micropipeta ou alça estéril foram inoculadas 10 placas de RODAC, 10 placas de Petrifilm™ AC e 10 de Petrifilm™ YM a partir de diluições realizadas de suspensões microbianas preparadas no dia do teste e ajustadas para conterem aproximadamente 100 UFC/10 µL. *P. aeruginosa* foi aplicada ao RODAC-TSA e ao Petrifilm™ AC, enquanto que *C. albicans* foi aplicada ao RODAC-TSA e Petrifilm™ YM. As placas foram incubadas a 35°C por 24/48hs. Após este período de incubação, foram anotados os resultados das leituras obtidas em todas as placas verificando se todas as placas foram capazes de detectar os inóculos aplicados (avaliação qualitativa).

Teste Quantitativo - Capacidade de recuperação de microrganismos inoculados em superfícies-teste:

Foram preparadas 10 placas de RODAC-TSA, 10 placas de Petrifilm AC e 10 de Petrifilm YM, amostrando-se diretamente superfícies-teste previamente inoculadas com microrganismos desafio *C. albicans* e *P. aeruginosa*.

Com auxílio de uma micropipeta ou alça estéril, foi retirado 10µL da diluição de microrganismos contendo cerca de 100 células e inoculado em áreas delimitadas de superfícies de inox previamente esterilizadas e na palma de luvas cirúrgicas de látex natural estéreis. O volume de inóculo foi espalhado suavemente por uma área de aproximadamente 20 a 30 cm² destas superfícies aguardando-se completa secagem do campo. O teste foi realizado em duplicata para cada metodologia, e controlada a concentração do inóculo aplicado.

As placas de RODAC-TSA e Petrifilm™ AC ou YM foram aplicadas às áreas durante 10 segundos, e após amostragem as mesmas foram incubadas a 35°C por

24/48hs. Após período de incubação foi realizada a contagem do número de microrganismos recuperados.

Os resultados estão registrados na tabela abaixo.

Para o Cálculo da porcentagem de recuperação foi utilizada a fórmula:

$$\text{Rec\%} = \frac{(C_{\text{petr/RODAC}} \times D)}{(C_L \times D)} \times 100$$

Onde:

Rec % – Recuperação de microrganismos em porcentagem

CI – Crescimento dos inóculos dos microrganismos no meio TSA controle

C_{PET/RODAC} – Crescimento dos microrganismos no Petrifilm™ ou RODAC

D – Fator de Diluição

Após realização das contagens das placas para cada uma das diluições, os resultados foram analisados quanto à especificação de recuperação maior que 70% e reprodutibilidade nas duplicatas.

Resultados

Testes qualitativos

Tanto as placas RODAC quanto o Petrifilm™ AC e YM foram capazes de detectar inóculos da ordem de 100 células em todas as replicatas de placas e filmes adesivos nos três dias diferentes de teste, garantindo assim a capacidade promotora de crescimento nos dois métodos.

Testes quantitativos

As tabelas abaixo apresentam os resultados obtidos com microrganismos inoculados em superfície de inox e palmas de luvas e suas respectivas recuperações com amostragem por RODAC e Petrifilm™ AC e YM.

Tabela 1: Resultados obtidos nos testes de inoculação e recuperação de microrganismos em superfície de Inox

Teste Quantitativo – Inox						
Microrganismos	Inóculo	Contagens Rodac	Contagens Petrifilm™ AC	Contagens Petrifilm™ YM	% Rec. Rodac	% Rec. Petri Film
<i>P. aeruginosa</i>	130 UFC/10ul	53 UFC/20 cm ²	110 UFC/30cm ²	–	41 %	84 %
<i>P. aeruginosa</i>	130 UFC/10ul	35 UFC/20 cm ²	96 UFC/30cm ²	–	27 %	74 %
Média	130 UFC/10ul	44 UFC/20 cm ²	103 UFC/30cm ²	–	34%	79 %
<i>C. albicans</i>	81 UFC/10ul	52 UFC/20 cm ²	–	74 UFC/30cm ²	64 %	91 %
<i>C. albicans</i>	81 UFC/10ul	44 UFC/20 cm ²	–	60 UFC/30cm ²	54 %	74 %
Média	81 UFC/10ul	48 UFC/20 cm ²	–	67 UFC/30cm ²	59 %	82,50 %

Tabela 2: Resultados obtidos nos testes de inoculação e recuperação de microrganismos em palmas de luvas de latex

Teste Quantitativo – Luva						
Microrganismos	Inóculo	Contagens Rodac	Contagens Petrifilm™ AC	Contagens Petrifilm™ YM	% Rec. Rodac	% Rec. Petri Film
<i>P. aeruginosa</i>	130 UFC/10ul	35 UFC/20 cm ²	106 UFC/30 cm ²	–	27 %	82 %
<i>P. aeruginosa</i>	130 UFC/10ul	30 UFC/20 cm ²	92 UFC/30 cm ²	–	23%	71 %
Média	130 UFC/10ul	33 UFC/20 cm ²	99 UFC/30 cm ²	–	25%	76 %
<i>C. albicans</i>	81 UFC/10ul	42 UFC/20 cm ²	–	60 UFC/30cm ²	51 %	74 %
<i>C. albicans</i>	81 UFC/10ul	22 UFC/20 cm ²	–	56 UFC/30cm ²	27 %	69 %
Média	81 UFC/10ul	32 UFC/20 cm ²	–	58 UFC/30cm ²	39 %	72 %



Resultados de % de Recuperação Média do Rodac X Petrifilm em superfície de Inox e Luvas inoculadas com P.aeruginosa e C. albicans

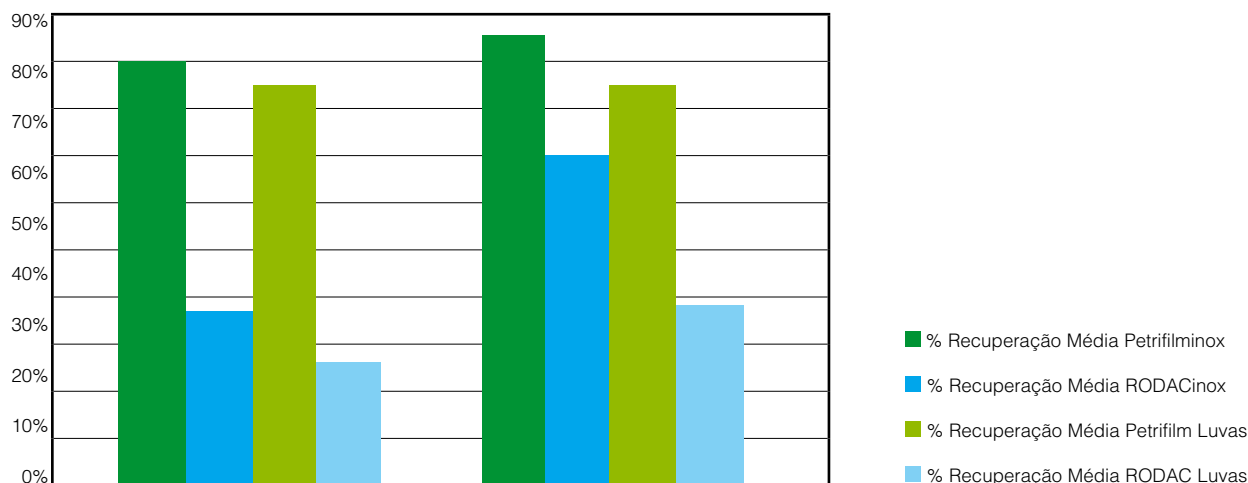


Gráfico de recuperação nos testes quantitativos

O gráfico acima representa a % média de recuperação dos microrganismos inoculados em diferentes tipos de superfícies (inox e palmas de luvas de látex), comumente objetos de amostragem para controle de carga microbiana em ambientes classificados.

Discussão e Conclusão

Foram realizados testes qualitativos e quantitativos do Petrifilm™ AC e YM em comparação com o método referência utilizando placas RODAC-TSA.

Os testes qualitativos demonstraram que houve crescimento em todas as placas Petrifilm™ AC e YM em todos os dias de testes realizados, assim como em todas as Placas de RODAC-TSA analisadas. Estes resultados representaram que as duas metodologias possuem sensibilidade para detectar baixas concentrações de microrganismos, e a fertilidade dos meios é satisfatória.

No teste quantitativo representado no gráfico verificou-se que a porcentagem de recuperação de microrganismos das Placas Petrifilm™ AC e YM está acima de 70% tanto para superfícies de inox, quanto para as luvas de látex, e para os dois microrganismos teste utilizados.

Já a recuperação de microrganismos com as placas RODAC-TSA foram sistematicamente inferiores a 70%,

muito abaixo da especificação necessária para que o método possa ser considerado validado.

Embora a área de amostragem do Petrifilm™ seja de 30 cm², contra os 20 cm² do RODAC, a diferença observada foi marcante, não sendo passível de justificativa por esta diferença.

As duplicatas de cada método mostraram-se satisfatórias, sendo os dois métodos considerados precisos.

Conclui-se com estes resultados dos testes qualitativos (*Grow Promotion*) e quantitativos, que o método de amostragem em superfícies com Petrifilm™ AC e YM foi tão eficaz quanto em placas RODAC-TSA, sendo a recuperação de microrganismos mais segura, mais prática e mais confiável.

O uso de meios de cultura diferenciados à base de ágar padrão e Agar Sabouraud melhoram a discriminação de possíveis agentes de contaminação ambiental pesquisando-se bactérias e leveduras, permitindo decisão mais fácil quanto à escolha de sanitizantes adequados e ações de limpeza mais efetivas em função dos resultados.

Aliando-se a alta performance do método às vantagens já apresentadas quanto à praticidade no uso, longo período de validade, mínimo espaço para estocagem, geração de resíduos no descarte, Petrifilm™ pode ser uma alternativa de otimização das rotinas de amostragem para controle de carga microbiana em ambientes controlados

