



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

www.anvisa.gov.br

**Consulta Pública nº 39, de 29 de abril de 2010.**  
**D.O.U de 30/04/2010**

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso das atribuições que lhe confere o inciso IV do art. 11 e o art. 35 do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso V e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 26 de abril de 2010,

considerando que é responsabilidade da ANVISA a atualização e revisão periódica da Farmacopéia Brasileira;

considerando o Processo de Revisão de Monografias da Farmacopéia Brasileira e o desenvolvimento e revisão de métodos gerais da Farmacopéia Brasileira por instituições de ensino superior;

considerando que devem ser observadas as especificações de qualidade determinadas pela Farmacopéia Brasileira, para fins de controle de qualidade, registro e análises fiscais de produtos sujeitos ao regime de vigilância sanitária;

adota a seguinte Consulta Pública e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Fica aberto, a contar da data de publicação desta **Consulta Pública**, o prazo de 30 (trinta) dias para que sejam apresentadas sugestões quanto às propostas de **revisão e atualização dos Métodos Gerais da Farmacopéia Brasileira**, além da **inclusão de novos métodos** descritos no Anexo I.

Art. 2º Informa que os métodos gerais descritos no Anexo I, estarão disponíveis, na íntegra, durante o período de consulta no endereço eletrônico [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br), e as sugestões deverão ser encaminhadas por escrito para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/DIMCB/Farmacopéia Brasileira, SAI trecho 5 área especial nº 57, Bloco "E", 1º Andar, Sala 4, Brasília/DF, CEP 71.205.050, ou Fax: (061) 3462-6791 ou e-mail: [cp\\_39.farmacopéia@anvisa.gov.br](mailto:cp_39.farmacopéia@anvisa.gov.br).

Art. 3º Findo o prazo estipulado no Art. 1º, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária submeterá à Comissão da Farmacopéia Brasileira as contribuições enviadas, para avaliação e os encaminhamentos devidos.

*DIRCEU RAPOSO DE MELO*

#### **ANEXO I – MÉTODOS GERAIS DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA**

- **PREPARAÇÃO DE PRODUTOS ESTÉREIS**
- **ENSAIO BIOLÓGICO – DOSEAMENTO DA HEPARINA NOS FATORES DE COAGULAÇÃO.**
- **ENSAIO BIOLÓGICO – DOSEAMENTO DOS FATORES DE COAGULAÇÃO ATIVADOS.**
- **ENSAIO BIOLÓGICO – DOSEAMENTO DO FATOR II DA COAGULAÇÃO HUMANA SANGUÍNEA.**
- **ENSAIO BIOLÓGICO – DOSEAMENTO DO FATOR VII DA COAGULAÇÃO HUMANA SANGUÍNEA.**
- **ENSAIO BIOLÓGICO – DOSEAMENTO DO FATOR IX DA COAGULAÇÃO HUMANA SANGUÍNEA.**
- **ENSAIO BIOLÓGICO – DOSEAMENTO DO FATOR X DA COAGULAÇÃO HUMANA SANGUÍNEA.**

X. PREPARAÇÃO DE PRODUTOS ESTÉREIS

X.1. ESTERILIZAÇÃO E GARANTIA DE ESTERILIDADE

### X.1.1. ESTERILIZAÇÃO

Esterilidade é a ausência de microrganismos viáveis. Como a obtenção da esterilidade de qualquer item isolado de uma população submetida ao processo de esterilização não pode ser garantida nem demonstrada, a esterilidade de um lote é definida em termos probabilísticos por meio de um processo de produção adequadamente validado.

A inativação de microrganismos por meios físicos ou químicos segue uma lei exponencial e, portanto, há uma probabilidade estatística de que microrganismos possam sobreviver ao processo de esterilização. Para um determinado processo, a probabilidade de sobrevivência é determinada pelo número, tipo e resistência dos microrganismos presentes e pelo ambiente durante a esterilização. O nível de garantia de esterilidade de um processo de esterilização é o grau de garantia que o processo em questão esteriliza uma população de itens, sendo expresso como a probabilidade de um item não estéril naquela população. O nível de garantia de esterilidade de  $10^{-6}$ , por exemplo, indica a probabilidade de não mais que um microrganismo viável em  $1 \times 10^6$  itens esterilizados do produto final. O nível de garantia de esterilidade de um processo para um determinado produto é estabelecido por meio de estudos de validação apropriados e geralmente é aceito que produtos injetáveis submetidos à esterilização terminal ou dispositivos críticos estéreis alcancem uma probabilidade de sobrevivência microbiana de  $10^{-6}$ . Com produtos termoestáveis, a abordagem freqüente é exceder o tempo crítico necessário para conseguir a probabilidade de sobrevivência microbiana de  $10^{-6}$  (sobremorte). Contudo, para produtos termosensíveis, a abordagem de sobremorte não pode ser empregada e o desenvolvimento do ciclo de esterilização depende do conhecimento da carga microbiana do produto.

O valor D, tempo de redução decimal, é o tempo em minutos necessário para reduzir a população microbiana em 90% ou 1 ciclo logarítmico, a uma condição específica, isto é, para uma fração sobrevivente de 1/10. Portanto, onde o valor D de uma preparação de indicador biológico de, por exemplo, esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, é de 1,5 minutos sob os parâmetros totais de processo, isto é, a 121 °C, se for tratado por 12 minutos sob as mesmas condições, pode-se declarar que o incremento de letalidade é de 8D. A aplicação deste incremento na esterilização do produto depende da carga microbiana inicial. Assumindo que a carga microbiana do produto apresenta resistência ao processo de esterilização igual à resistência do indicador biológico e que a carga inicial do produto é de  $10^2$  microrganismos, o incremento de letalidade de 2D reduziria a carga microbiana a 1 (teoricamente  $10^0$ ) e, conseqüentemente, 6D adicionais resultaria em uma probabilidade de sobrevivência microbiana calculada de  $10^{-6}$ . Sob as mesmas condições, um incremento de letalidade de 12D pode ser usado como abordagem típica para obtenção da sobremorte. Geralmente, a probabilidade de sobrevivência da carga microbiana presente no material, cujo processo de validação da esterilização está sendo realizado, não é a mesma do indicador biológico. Para o uso válido, portanto, é essencial que a resistência do Indicador Biológico seja maior que aquela da biocarga do material a ser esterilizado, sendo necessário assumir a situação de pior caso durante a validação. O valor D do indicador biológico a ser empregado deve ser determinado ou verificado para cada programa de validação e também na ocorrência de alteração deste programa.

A determinação de curvas de sobrevivência, ou abordagem de ciclo fracionado, pode ser empregada para determinar o valor D do indicador biológico escolhido para o processo de esterilização específico. Esta abordagem também pode ser usada para avaliar a resistência da biocarga do produto. Ciclos fracionados são utilizados para avaliar a redução da contagem microbiana ou para alcançar fração negativa. Estes números podem ser usados tanto para determinar a letalidade do processo sob condições de produção quanto para estabelecer ciclos de esterilização apropriados. Um indicador biológico adequado, tal como a preparação de *Geobacillus stearothermophilus*, também deve ser usado durante a esterilização de rotina. Qualquer método de carga microbiana utilizado para a garantia de esterilidade requer vigilância adequada da resistência microbiana do item para detectar quaisquer mudanças.

### X.1.2 MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Um método de esterilização tem por finalidade remover ou destruir todas as formas de vida, animal ou vegetal, macroscópica ou microscópica, saprófitas ou não, presentes no produto considerado, sem garantir a inativação de toxinas e enzimas celulares. O procedimento selecionado para atingir o nível de garantia de esterilidade depende do conhecimento da natureza do material a ser esterilizado, do processo de esterilização a ser empregado e das alterações que podem ocorrer no material, em função da esterilização. O conhecimento do tipo, da quantidade e da fonte dos contaminantes nos produtos, antes da esterilização, e a aplicação de métodos para minimizar tal contaminação e preveni-la pós-processamento contribuem para assegurar o êxito da esterilização.

Este capítulo apresenta conceitos e princípios envolvidos no controle de qualidade de produtos que devem cumprir a exigência de esterilidade e inclui descrição dos métodos de esterilização e instruções para processo asséptico.

### **X.1.2.1 MÉTODOS FÍSICOS**

#### **X.1.2.1.1 ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR**

O calor é o agente esterilizante mais simples, econômico e seguro de que se dispõe, contudo a sensibilidade dos diferentes microrganismos à ação do calor é bastante variada, sendo as formas esporuladas as mais resistentes. A eficiência na inativação dos microrganismos é dependente da temperatura, tempo de exposição e presença de água, pois na presença desta são exigidos menores tempo de exposição e temperaturas. A esterilização pelo calor úmido causa a coagulação das proteínas celulares dos microrganismos, enquanto a esterilização pelo calor seco se dá em função de processos oxidativos, os quais necessitam de altas temperaturas e longo tempo de exposição.

#### **Calor Úmido**

O processo de esterilização empregando vapor saturado sob pressão é realizado em câmara denominada autoclave. O princípio básico de operação é a substituição do ar da câmara por vapor saturado. Para deslocar ar mais eficientemente da câmara e de dentro dos produtos, o ciclo de esterilização pode incluir estágios de evacuação de ar e de vapor.

Para este método de esterilização, a condição de referência para esterilização de preparações aquosas é de aquecimento de no mínimo 121 °C por pelo menos 15 minutos. Combinações distintas de tempo e temperatura podem ser utilizadas, contanto que validadas e que demonstrem a eficácia do processo escolhido, proporcionando um nível adequado e reprodutível de letalidade quando operado rotineiramente dentro das tolerâncias estabelecidas. São aplicados procedimentos e precauções de modo a atingir um nível de segurança de esterilidade de  $10^{-6}$  ou melhor. Combinações de tempo e temperatura devem ser estabelecidas baseadas em fatores como natureza do material e sua termolabilidade, penetrabilidade do vapor no produto a ser esterilizado e outros parâmetros definidos no processo de validação. Quando for utilizada temperatura de esterilização diferente de 121 °C, o conceito de  $F_0$  deve ser empregado. O  $F_0$  em uma temperatura particular diferente de 121 °C, é o tempo em minutos necessário para fornecer a letalidade equivalente àquela fornecida a 121 °C durante um referido tempo.

$F_0$  é uma medida da eficácia esterilizante, isto é, é o número de minutos de esterilização térmica por vapor à determinada temperatura fornecida a um recipiente ou unidade de produto num dado valor Z.

Para garantir a eficiência do processo de esterilização, a distribuição da carga na câmara deve ser feita de maneira a propiciar o contato do vapor com as regiões de mais difícil acesso. Para materiais esterilizados por calor úmido, é aceitável que se alcance uma probabilidade de sobrevivência microbiana da ordem de  $10^{-6}$ . Para produtos termoestáveis, o tempo necessário para atingir a condição anterior pode ser excedido, resultando em sobremorte, o que não se aplica a produtos que possam sofrer alteração em função da exposição excessiva ao calor. Nesta situação, o desenvolvimento do ciclo de esterilização depende, especialmente, do conhecimento da carga microbiana presente no produto, que deve ser determinada em quantidade substancial de lotes do produto, anteriormente à esterilização. O valor D do indicador biológico adequado usado, como *Geobacillus stearothermophilus*, deve ser avaliado no programa de validação e na ocorrência de alguma alteração deste programa.

#### **Calor seco**

A esterilização térmica por calor seco é realizada em estufa com distribuição homogênea do calor, que pode ser obtida por circulação forçada de ar. Podem ser esterilizados artigos como vidros, metais, pós, vaselinas, gorduras, ceras, soluções e suspensões oleosas e tecidos especiais. Este processo é aplicado principalmente para materiais sensíveis à esterilização por calor úmido. Para este método de esterilização, a condição de referência é uma temperatura mínima de 160 °C por pelo menos 2 horas. Combinações distintas de tempo e temperatura podem ser utilizadas, contanto que validadas e que demonstrem a eficácia do processo escolhido, proporcionando um nível adequado e reprodutível de letalidade quando operado rotineiramente dentro das tolerâncias estabelecidas.

Um nível de garantia de esterilidade de  $10^{-12}$  é considerado aceitável para produtos termoestáveis. Um exemplo de indicador biológico para validar e monitorar a esterilização por calor seco é a preparação de esporos de *Bacillus atrophaeus*.

O processo empregando o calor seco também pode ser usado para esterilização e despirogenização como parte integrante do processo de enchimento asséptico, onde se requer temperaturas muito altas devido ao menor tempo de exposição ao calor. Os processos contínuos usualmente necessitam de um estágio de resfriamento anterior ao processo de envase. Em função do menor tempo de exposição do material, o programa de validação deve abranger parâmetros como a uniformidade de temperatura e o tempo de permanência.

O calor seco em temperaturas maiores que 220 °C pode ser utilizado para a esterilização e despirogenação de vidraria. Neste caso, um desafio com endotoxina bacteriana deve fazer parte do programa de validação, demonstrando uma redução de no mínimo 3 ciclos logarítmicos de endotoxina resistente ao calor, ou seja, testar materiais inoculados com no mínimo 1000 unidades de endotoxina bacteriana. O teste com lisado de *Limulus* pode ser usado para demonstrar que a endotoxina foi inativada a não mais do que 1/1000 da quantidade original, sendo que o remanescente de endotoxina é medido para garantir a redução de 3 ciclos logarítmicos.

#### **X.1.2.1.2. ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÃO IONIZANTE**

As radiações ionizantes são emissões de alta energia, sob a forma de ondas eletromagnéticas ou partículas, que ao se chocarem com os átomos do material irradiado alteram sua carga elétrica por deslocamento de elétrons, transformando os átomos irradiados em íons positivos ou negativos. Quando estas radiações atravessam as células criam hidrogênio livre, radicais hidroxilas e alguns peróxidos, os quais por sua vez podem causar diferentes lesões intracelulares. As principais fontes de radiação são: raios alfa, beta, gama e raios X. Os dois tipos de radiação ionizante em uso são decaimento de radioisótopo (radiação gama) e radiação por feixe de elétrons. Os produtos são expostos a uma radiação ionizante na forma de radiação gama de uma fonte radioisotópica adequada (por exemplo, cobalto 60) ou de um feixe de elétrons energizados por meio de um acelerador de elétrons.

Além da possibilidade do processamento a baixas temperaturas, o que permite a esterilização de produtos termosensíveis, a esterilização por radiação ionizante possui vantagens como a baixa reatividade química e o fato de existirem poucos parâmetros a serem controlados, sendo imprescindível o controle da dose de radiação absorvida. A dose de radiação estabelecida para a esterilização deve garantir o não comprometimento dos materiais a serem esterilizados. Para a radiação gama, a validação do processo inclui o estabelecimento da compatibilidade do material, o estabelecimento do modelo de carregamento do produto e o mapeamento de dose no recipiente de esterilização, identificando as zonas de doses máxima e mínima de radiação, a definição do tempo de exposição e a comprovação da aplicação da dose de esterilização requerida. Para irradiação por feixe de elétrons, devem ser controlados ainda voltagem, corrente, velocidade da esteira transportadora e dimensão de varredura do feixe de elétrons.

Para este processo de esterilização, a dose absorvida de referência é de 25 kGy, porém em algumas situações há necessidade de seleção de uma dose maior ou menor. A dose escolhida deve oferecer um nível de letalidade adequado e reprodutível quando o processo é operado rotineiramente dentro das tolerâncias estabelecidas. Procedimentos e precauções devem ser aplicados para atingir um nível de garantia de esterilidade de  $10^{-6}$  ou melhor.

Para validar a eficácia desta esterilização, especialmente quando se utilizam doses menores, é necessário determinar a resistência à radiação da carga microbiana do produto. Padrões de carregamento de produto específico e a distribuição de doses mínimas e máximas absorvidas devem ser estabelecidos. As doses absorvidas são normalmente medidas através de dosímetros específicos, como suporte plástico padronizado que mostra intensificação da cor proporcional à quantidade de radiação absorvida. A abordagem de ciclo fracionado fornece os dados utilizados para determinar o valor  $D_{10}$  do indicador biológico, informação aplicada para extrapolar a quantidade de radiação absorvida para estabelecer uma probabilidade adequada de sobrevivência microbiana. Atualmente, a dose se baseia na resistência à radiação da carga microbiana heterogênea natural contida no produto a ser esterilizado. Os procedimentos de validação podem usar a exposição de produto inoculado, usando organismos resistentes, como *Bacillus pumilus*, ou exposição de amostras de produto acabado da linha de produção à dose subletal de processo.

O procedimento para seleção da dose de radiação baseado na avaliação da resistência dos microrganismos constituintes da carga microbiana do produto a ser esterilizado, possibilita uma determinação mais representativa da resistência desta ao se trabalhar com microrganismos com diferentes suscetibilidades à radiação. Este procedimento exige a enumeração da população microbiana em amostragem representativa de diferentes lotes de produto. Com o conhecimento da carga microbiana, a dose de radiação é estabelecida baseando-se em tabela disponível na literatura. Um outro método que

permite o estabelecimento da dose de radiação baseia-se no emprego de incrementos de doses de radiação até obter-se, no máximo, uma amostra positiva em 100 unidades irradiadas. Esta informação provê a base para extrapolação desta dose e obtenção da dose de radiação. Avaliações periódicas devem ser feitas para garantir que os valores estabelecidos continuam sendo efetivos (referência: ISO 11137-1: 2006 - *Sterilization of health care products - Radiation - Part 1: Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices*).

A eficiência do ciclo de esterilização deve ser avaliada periodicamente pela determinação da carga microbiana do produto ou pelo emprego de indicador biológico e pelo uso de dosímetros calibrados.

#### **X.1.2.1.3. ESTERILIZAÇÃO POR FILTRAÇÃO**

A filtração é empregada para esterilização de soluções termosensíveis por remoção física dos microrganismos contaminantes. O material filtrante não pode liberar fibras ou materiais extraíveis indesejáveis para a solução a ser filtrada, o que restringe a natureza do elemento filtrante a vidro, metal e polímeros. A montagem de um filtro consiste de uma matriz porosa inserida em um abrigo impermeável. A eficiência de um meio ou substrato filtrante depende do tamanho do poro do material, da adsorção de microrganismos sobre ou dentro da matriz do filtro e do mecanismo de peneira ou exclusão. O efeito de exclusão por tamanho é função da abertura (diâmetro) dos poros, e a adsorção depende da composição, espessura do elemento filtrante e fluido que está sendo filtrado.

O tamanho dos poros das membranas filtrantes é estimado por valor nominal que reflete a capacidade da membrana do filtro de reter microrganismos representados por cepas específicas. A filtração para fins de esterilização é normalmente realizada com membranas de graduação de tamanho de poro nominal de 0,2 $\mu$ m, ou menor. Estas membranas de filtração esterilizante, classificadas como 0,22 $\mu$ m ou 0,2 $\mu$ m, dependendo do fabricante, são capazes de reter 100% de uma cultura contendo 10<sup>7</sup> microrganismos de *Brevundimonas diminuta* ATCC 19146, por cm<sup>2</sup> de superfície de membrana filtrante, sob uma pressão mínima de 30 psi (2,0 bar).

O usuário é responsável pela escolha do filtro em função da natureza do material a ser filtrado, que atenda à necessidade do processo de esterilização, devendo também determinar se os parâmetros empregados na produção influenciarão a eficiência da retenção microbiana. Uma vez que a eficiência do processo de filtração também é influenciada pela biocarga da solução a ser filtrada, é importante a determinação da qualidade microbiana das soluções antes da filtração, bem como o estabelecimento de parâmetros como pressão, taxa de fluxo e características da unidade filtrante.

O valor de redução logarítmica também pode ser utilizado para avaliar a capacidade de retenção da membrana filtrante. Por exemplo, um filtro de 0,2 $\mu$ m, que pode reter 10<sup>7</sup> microrganismos de uma cepa específica, terá um valor de redução logarítmica de não menos que 7, sob condições declaradas.

As membranas filtrantes comercialmente disponíveis incluem acetato de celulose, nitrato de celulose, fluorcarbonato, polímeros acrílicos, poliéster, policarbonato, cloreto de polivinila, vinil, nylon, polytef e ainda, membranas metálicas. Os filtros de membrana, por serem filmes poliméricos, oferecem muitas vantagens e algumas desvantagens quando comparados aos filtros de profundidade como porcelana ou material sinterizado. Como boa parte da superfície da membrana é um espaço vazio ou aberto, a correta montagem e esterilização do filtro proporcionam a vantagem de uma alta taxa de fluxo. Uma desvantagem é que, devido à fragilidade da membrana, deve-se garantir a ausência de ruptura durante a montagem, esterilização ou uso.

O sistema de filtração deve ser testado antes e após o processo de filtração para garantir a manutenção de sua integridade durante o processo de filtração. Testes típicos de uso incluem o teste do ponto de bolha, o teste de fluxo de ar difusivo, o teste de retenção sob pressão e o teste de fluxo progressivo. O teste de ponto de bolha consiste em teste não destrutivo, cuja denominação decorre da visualização de bolhas após a aplicação de uma determinada pressão sobre o filtro. Como exemplo, após a filtração de cerca de dois litros de água destilada estéril, aplica-se pressão constante de nitrogênio, durante 5 minutos para membranas de éster de celulose de 0,2 $\mu$ m. Para cada tipo de filtro há um valor limite de pressão a ser suportado, sem que apresente a formação de bolhas, indicando a resistência do material filtrante. Os testes devem ser correlacionados com a retenção de microrganismos. Testes adicionais realizados pelo fabricante do filtro, como o de desafio microbiano, não são normalmente repetidos pelo usuário.

#### **X.1.2.2 MÉTODO QUÍMICO**

### **X.1.2.2.1. GÁS ÓXIDO DE ETILENO**

A esterilização por gás pode ser o método de escolha para materiais que não resistem a altas temperaturas como no processamento por calor seco ou calor úmido. O agente ativo geralmente empregado na esterilização por gás é o óxido de etileno. Entre as desvantagens deste agente esterilizante estão suas propriedades mutagênicas, a possibilidade de resíduos tóxicos nos materiais tratados e sua natureza altamente inflamável, exceto quando em certas misturas com gases inertes. O processo de esterilização é geralmente realizado em uma câmara pressurizada projetada de forma semelhante à autoclave, mas com características específicas como sistema para degaseificação após a esterilização e minimização da exposição dos operadores ao gás.

O programa de qualificação do processo de esterilização com óxido de etileno é mais amplo que de outros processos de esterilização, visto que além da temperatura, devem ser controlados a umidade, vácuo/pressão positiva e a concentração de óxido de etileno. É importante determinar e demonstrar que todos os parâmetros críticos do processo estão adequados no interior da câmara de esterilização durante todo o ciclo. Como os parâmetros de esterilização aplicados aos produtos a serem processados são críticos, é recomendável o pré-condicionamento da carga para minimizar o tempo de exposição à temperatura requerida. O programa de validação é geralmente realizado empregando o produto inoculado ou produto simulado inoculado com preparações apropriadas como esporos de *Bacillus atrophaeus*. Os indicadores biológicos normalmente são empregados para estabelecer a probabilidade final de sobrevivência microbiana usando o conceito de ciclo fracionado para se projetar um ciclo de esterilização com óxido de etileno, e devem ser usados em cargas do produto ou produto simulado, com câmara cheia.

O indicador biológico deve ser empregado no monitoramento de ciclos de rotina, além do planejamento do ciclo de esterilização por óxido de etileno. Outro aspecto importante do planejamento do processo de esterilização é a definição do tipo de acondicionamento do material a ser processado e sua distribuição na câmara de esterilização, devido à limitada capacidade de difusão do óxido de etileno em áreas mais internas do produto.

### **X.1.3 VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE ESTERILIZAÇÃO**

A validação deve demonstrar de forma documentada que o processo de esterilização estabelecido irá consistentemente fornecer produtos que atendam o nível de garantia de esterilidade requerido. Os produtos esterilizados no processo validado devem atender as especificações pré-determinadas e as características de qualidade relacionadas à funcionalidade e segurança.

Uma vez o processo validado, o mesmo deverá ser revalidado periodicamente e após alterações de produto, equipamentos e processo, que possam comprometer o nível de garantia de esterilidade especificado.

Os principais elementos da validação são: Qualificação de Instalação, Qualificação de Operação e Qualificação de Desempenho.

#### **X.1.3.1. QUALIFICAÇÃO DE INSTALAÇÃO**

O plano de qualificação de instalação deve fornecer evidência documentada que o equipamento e todos os itens auxiliares foram fornecidos, instalados e funcionam de acordo com as especificações. Deve-se demonstrar que o equipamento de esterilização, seus componentes, itens auxiliares e suprimentos, como vapor, água e ar, foram corretamente projetados, instalados e calibrados.

A fim de atender aos parâmetros e limites recomendados para a esterilização, é necessário o emprego de instrumentação apropriada para monitorar e controlar os parâmetros críticos como temperatura, tempo, umidade, concentração do gás esterilizante ou radiação absorvida. Estes instrumentos devem ser avaliados na qualificação de instalação.

A qualificação de instalação compreende os seguintes elementos: equipamento, instalação e função.

No que se refere ao equipamento e instalação, as especificações do esterilizador, itens auxiliares e serviços, os procedimentos operacionais, a localização de instalação e a documentação devem ser previamente definidas e verificadas na qualificação de instalação, garantido sua conformidade. Para garantir a função, deve ser verificado que o equipamento e os sistemas de segurança operacional funcionam de acordo com suas especificações, os ciclos de operação estão de acordo com o definido e que não há evidência de vazamento das utilidades ou esterilizador, quando aplicável.

Os procedimentos documentados para a qualificação de instalação devem especificar como cada elemento da qualificação é planejado, realizado e revisado. A documentação que suporta a qualificação de instalação inclui descrição das características físicas e operacionais do equipamento, seus componentes e serviços. Desenhos e diagramas de processo e instrumentação devem ser verificados contra a configuração proposta e atualizados, quando necessário. Sistemas de segurança aplicáveis devem ser avaliados para garantir desempenho, qualidade e segurança dos equipamentos e operadores.

A qualificação da instalação é necessária para novos equipamentos ou quando o esterilizador existente é substituído ou re-aloçado. A qualificação deve ser refeita a intervalos de tempo definidos, e ao menos parcialmente quando ocorrerem modificações que possam alterar a eficácia do processo de esterilização, como substituição ou reforma de equipamentos ou partes, modificações nos suprimentos de processo e alteração em fonte radioativa

#### **X.1.3.2. QUALIFICAÇÃO DE OPERAÇÃO**

A qualificação de operação deve demonstrar que o equipamento instalado é capaz de realizar o processo de esterilização especificado dentro dos intervalos definidos. O intervalo de parâmetros e os limites de operação devem ser estabelecidos na definição do processo. Antes da qualificação de operação, o estado de calibração de toda instrumentação usada para monitorar, controlar, indicar e registrar deve ser confirmado.

Para autoclaves e outros esterilizadores que empregam processo térmico, devem ser realizados estudos de distribuição do calor em diferentes posições considerando o tamanho da câmara e a carga. Deve-se confirmar que a câmara (vazia e cheia) opera dentro dos parâmetros críticos em todos os seus principais locais. O número e posição dos termopares são determinados pelo tipo e configuração da carga, tamanho de equipamento, tipo de instrumento e ciclo empregado. Uma faixa aceitável de temperatura na câmara vazia é  $\pm 1$  °C quando a temperatura da câmara é 121 °C. Para esterilizadores a óxido de etileno, a umidade relativa, concentração do gás e a temperatura devem ser monitorados por sensores distribuídos em posições adequadas. Sistemas de segurança aplicáveis devem ser testados. Softwares de controle devem ser validados e desafiados em condições de falha. A penetração e distribuição da radiação ionizante na carga deve ser realizada e monitorada por dosímetros. A operação de qualificação de filtros esterilizantes é feita através do teste de integridade dos filtros, medidas de pressão diferencial e velocidade de fluxo. Como os fluidos esterilizados por membranas filtrantes podem ser expostos ao ambiente durante o processamento seguinte, o controle ambiental e a qualificação e/ou validação da área de manuseio asséptico devem ser parte integrante do processo de esterilização por filtração.

#### **X.1.3.3. QUALIFICAÇÃO DE DESEMPENHO**

A qualificação de desempenho deve demonstrar que o processo de esterilização é capaz de atingir repetidamente o nível de garantia de esterilidade pré-determinado para as cargas definidas de produtos, que o equipamento opera consistentemente de acordo com critérios pré-determinados e que o produto atende os requisitos especificados de segurança, qualidade e desempenho.

A qualificação de desempenho compreende avaliações físicas e microbiológicas que demonstrem a eficácia e reprodutibilidade do processo de esterilização, mantendo as características especificadas do produto.

Nos estudos físicos devem ser considerados critérios como carga teste representativa do processo, embalagem idêntica ao produto, pré-condicionamento, perfil de temperatura e temperatura no ponto de referência, resposta de indicadores químicos, integridade de embalagem, documentação, entre outros. A carga para esterilização deve ser estabelecida e documentada, levando em consideração parâmetros como configuração, distribuição, orientação, densidade, dimensão, composição do material, uso e tipo de paletes. O produto ou material com características similares ao produto (produto simulado) usado para a qualificação deve ter embalagem idêntica ao produto e representar no mínimo o pior caso da carga de rotina de produção, ou seja, a configuração mais difícil de esterilizar. Critérios para reutilização de carga devem ser definidos, sendo que as mesmas devem ser equilibradas às condições ambientais ou aeradas antes do re-uso. Os dados gerados devem demonstrar a conformidade com os parâmetros físicos e químicos aplicáveis. A relação entre as condições de posições de monitoramento durante a qualificação e a rotina devem ser estabelecidas. A qualificação de desempenho física deve demonstrar a reprodutibilidade do processo com mínimo de três (3) ciclos consecutivos para verificar o atendimento de todos os critérios de aceitação.

A qualificação microbiológica deve seguir requisitos específicos para cada agente esterilizante. Diferentes métodos podem ser usados na validação do processo de esterilização e incluem três (3) categorias: processo baseado na inativação da carga microbiana natural (biocarga), processo combinado com base na inativação de microrganismo referência e conhecimento da carga microbiana (biocarga e indicador biológico) e processo conservativo baseado na inativação de microrganismo referência (sobremorte ou *overkill*). Indica-se que o desafio microbiano seja executado nos parâmetros mínimos de processo e deve garantir o nível de garantia de esterilidade para todas as combinações de carga, podendo usar o pior caso de produto representante das famílias. Para cada tipo de carga a ser esterilizada, a reprodutibilidade do processo deve ser demonstrada empregando pelo menos três ciclos consecutivos. Os indicadores biológicos usados devem ser posicionados no e/ou sobre o produto em localização definida.

A qualificação de desempenho deve ser repetida quando alterações significativas forem propostas, como mudanças em desenho e embalagem do produto, configuração ou densidade de carga e equipamento ou processo de esterilização. Os efeitos destas mudanças nos estágios de validação do processo de esterilização devem ser avaliados.

#### **X.1.4. REVISÃO E APROVAÇÃO DA VALIDAÇÃO**

A revisão documentada dos dados de validação gerados nas qualificações de instalação, operação e desempenho deve ser feita para confirmar a aceitabilidade do processo de esterilização e definir a especificação do processo, incluindo parâmetros e tolerância.

O estágio final do programa de validação requer a documentação dos dados de apoio desenvolvidos na execução deste programa.

### **X.2. INDICADORES BIOLÓGICOS**

O indicador biológico é definido como uma preparação caracterizada de microrganismo específico que fornece uma resistência definida e estável a um determinado processo de esterilização. Bactérias formadoras de esporos são os microrganismos reconhecidos como apropriados para emprego como indicadores biológicos uma vez que, com exceção da radiação ionizante, estes microrganismos são significativamente mais resistentes aos processos de esterilização que os microrganismos da carga microbiana natural do produto. Um indicador biológico pode ser usado na qualificação de desempenho do equipamento de esterilização e no desenvolvimento e estabelecimento do processo de esterilização para um produto específico. Os indicadores biológicos são usados em processos de obtenção de produto estéril em seu recipiente final e na esterilização de equipamentos, materiais e componentes de embalagem empregados no processo asséptico. Os indicadores biológicos podem ainda ser utilizados para monitorar ciclos de esterilização em revalidações periódicas e para avaliar a capacidade do processo usado na descontaminação de isoladores ou salas limpas.

#### **X.2.1. TIPOS DE INDICADORES BIOLÓGICOS**

Há pelo menos três tipos de indicadores biológicos, sendo que cada tipo incorpora uma espécie microbiana com resistência conhecida ao processo de esterilização.

Um tipo de indicador biológico inclui os esporos que são adicionados a um suporte ou carreador (disco ou tira de papel de filtro, vidro, plástico ou outro material) embalado de forma a manter a integridade e viabilidade do material inoculado. Os carreadores e embalagens primárias não devem conter qualquer tipo de contaminação química, física ou microbiológica que possa comprometer o desempenho e estabilidade do indicador biológico e não podem sofrer alteração em função do processo de esterilização submetido. Os carreadores e embalagens primárias devem resistir ao transporte e manuseio até o momento do uso e devem evitar a perda do inóculo original durante o transporte, manuseio e armazenamento até o vencimento do período de validade.

Outro tipo de indicador biológico consiste de uma suspensão de esporos inoculada em unidades representativas do produto a ser esterilizado. Quando não for possível o emprego do produto real, pode-se inocular um produto simulado, que difere do produto real em algumas características, mas se comporta de forma semelhante quando submetido às condições de teste ou de esterilização. Uma suspensão de esporos de valor D conhecido deve ser utilizada para inoculação do produto real ou simulado, garantindo que quando do uso do produto simulado, este não comprometa a resistência do indicador biológico. A configuração física do produto a ser inoculado (real ou simulado) pode afetar a resistência da suspensão microbiana inoculada. No caso de produtos líquidos é recomendável a determinação do valor D e valor z do



indicador biológico no produto líquido especificado. A população, valor D, valor z onde aplicável e tempo de destruição do microrganismo devem ser determinados.

Valor z é a elevação de temperatura em graus necessária para reduzir o valor D em 90% ou produzir a redução de um ciclo logarítmico na curva de resistência térmica. O terceiro tipo é o indicador biológico auto-contido, apresentado de tal forma que a embalagem primária destinada para incubação após a esterilização contenha o meio de crescimento requerido para a recuperação do microrganismo. Neste caso, o sistema constituído pelo indicador biológico e o meio de crescimento do microrganismo deve ser resistente ao processo de esterilização e deve permitir a penetração do agente esterilizante. O valor D, tempo de destruição do microrganismo e o tempo de sobrevivência devem ser determinados para o sistema e não somente para a tira ou disco de papel que contém os microrganismos. Após a esterilização, as tiras ou discos contendo os microrganismos são colocados no meio de cultura por manipulação.

O indicador biológico auto-contido também pode consistir de uma suspensão de esporos em um meio de cultura contendo corante que indica a presença ou a ausência de crescimento após a incubação. A resistência do sistema auto-contido é dependente da penetração do agente esterilizante na embalagem, que deve ser controlada pelo fabricante por meio do desenho e composição do material que constitui a embalagem, ampola ou recipiente. O indicador biológico auto-contido na forma de ampola pode ser incubado diretamente após a exposição ao processo de esterilização, nas condições especificadas. A ausência ou a presença do crescimento microbiano é determinada visualmente, a partir da mudança de coloração de um indicador incorporado ao meio ou pela turbidez decorrente do desenvolvimento do microrganismo; ou ainda, pelo exame microscópico do meio inoculado. O indicador biológico auto-contido deve suportar o transporte e o manuseio durante o uso sem que ocorram quebras ou perda do inóculo original. Durante ou após o processo de esterilização, o material do qual é constituído o sistema auto-contido não deve reter ou liberar qualquer substância que possa inibir o crescimento de microrganismos sobreviventes. A capacidade promotora de crescimento dos microrganismos do meio de cultura após exposição ao processo de esterilização deve ser comprovada.

### **X.2.2. Preparação do Indicador Biológico**

Todas as operações envolvidas na preparação de indicadores biológicos devem ser monitoradas através de um sistema da qualidade documentado que permita a rastreabilidade de todos os materiais e componentes incorporados à suspensão microbiana, o carreador inoculado ou o indicador biológico. A preparação de suspensões estoque dos esporos dos microrganismos selecionados como indicadores biológicos requer o desenvolvimento de procedimentos apropriados incluindo seu cultivo, coleta, purificação e manutenção. As suspensões estoque devem conter, predominantemente, esporos latentes (não germinativos) mantidos em líquido não nutritivo. O produto final fornecido pelos fabricantes (suspensão microbiana, carreador inoculado ou indicador biológico) não deve conter microrganismo diferente do microrganismo-teste em número suficiente que possa afetar o produto. O sistema para minimizar a presença de microrganismos diferentes do microrganismo-teste deve ser validado, monitorado e registrado.

### **X.2.3. Seleção do Indicador Biológico para o processo de esterilização**

A escolha do indicador biológico requer conhecimento de sua resistência ao processo de esterilização específico para garantir que o sistema do indicador biológico proporciona desafio maior que o da carga microbiana presente no produto.

O uso eficiente dos indicadores biológicos para desenvolvimento do ciclo, processo e validação ou para monitoramento do processo de esterilização de rotina requer conhecimento do material a ser esterilizado incluindo seus componentes e material de embalagem. Apenas indicadores biológicos reconhecidos e especificados nas monografias devem ser usados no desenvolvimento ou validação de um processo de esterilização para garantir que o indicador biológico selecionado propicie um desafio maior ao processo de esterilização do que a carga microbiana presente no produto.

Nos casos do uso de indicadores biológicos com características diferentes daqueles comercialmente disponíveis, pode-se cultivar microrganismos descritos em literatura científica para preparo de indicadores biológicos. O usuário deve ser capaz de determinar os valores D e z para os indicadores domésticos. Quando indicador biológico não comercial for utilizado, a população, pureza e validade devem ser confirmadas para garantir a validade dos testes a serem realizados usando este indicador.

Quando a definição do processo de esterilização é baseada na carga microbiana do produto, esta deve ser quantificada e as resistências do indicador biológico e da carga microbiana devem ser

comparadas. O processo de esterilização deve resultar em nível de garantia de esterilidade de no mínimo  $10^{-6}$ .

O método de sobremorte (*overkill*) pode ser empregado no desenvolvimento do processo de esterilização e, neste caso, devem ser feitas considerações específicas relacionadas à suposta resistência usada no estabelecimento dos requisitos de letalidade do processo. Em geral, os processos de sobremorte são desenvolvidos com a suposição de que a carga microbiana é igual a  $10^6$  microrganismos altamente resistentes. Um processo 12 D é definido como o processo que provê letalidade suficiente para redução de 12 ciclos logarítmicos, equivalente a 12 vezes o valor D para microrganismos com resistência acima da resistência média dos microrganismos presentes na carga microbiana do produto. Ao assumir uma carga microbiana de  $10^6$  um processo de sobremorte resultará em uma probabilidade de não esterilidade menor que  $10^{-6}$ . O uso do processo de sobremorte e sua validação podem minimizar ou evitar a necessidade de quantificação e identificação da carga microbiana do produto.

Para o processo de calor úmido, esporos de cepas apropriadas de *Geobacillus stearothermophilus* estão disponíveis comercialmente como indicadores biológicos. Outros microrganismos formadores de esporos resistentes ao calor úmido como *Clostridium sporogenes*, *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus coagulans* também podem ser utilizados no desenvolvimento e validação de um processo de esterilização por calor úmido.

Para a validação do processo de esterilização via calor seco, podem ser empregados esporos de *Bacillus atrophaeus* spp. Durante a validação podem ser realizados estudos para avaliação da despirogenização no lugar da inativação microbiana, uma vez que a taxa de inativação de endotoxinas bacterianas é bem mais lenta que a inativação dos esporos de *Bacillus atrophaeus*. Na prática, uma redução da ordem de pelo menos três ciclos logarítmicos do nível de endotoxina resulta em uma probabilidade de não esterilidade menor que  $10^{-6}$ .

Para monitorar os processos de esterilização empregando radiação ionizante, esporos de *Bacillus pumilus* têm sido usados apesar de não ser prática usual. O método de estabelecimento da dose de radiação mais empregado não usa indicadores biológicos. Alguns microrganismos presentes na carga microbiana do material a ser esterilizado podem apresentar maior resistência ao processo de esterilização por radiação em comparação com os esporos de *Bacillus pumilus*.

Para o processo de esterilização por óxido de etileno são comumente utilizados esporos de subespécies de *Bacillus atrophaeus* var. *niger*, quando se emprega óxido de etileno 100% ou diferentes misturas de gases.

**Tabela 1** – Características exemplificativas de sistemas de indicadores biológicos disponíveis comercialmente

Processo de Esterilização	Valor D (minutos)	Faixa de valor D para seleção de indicador biológico (minutos)	Limites para resistência adequada (dependente do valor D em minutos)	
			Tempo de sobrevivência	Tempo de morte
Calor seco <sup>a</sup> (160 °C)	1,9	Mín. 1,0	Mín. 4,0	10,0
		Máx. 3,0	Máx. 14,0	32,0
Óxido de etileno <sup>b</sup> (600 mg/l, 54 °C, 60% UR)	3,5	Mín. 2,5	Mín. 10,0	25,0
		Máx. 5,8	Máx. 27,0	68,0
Calor úmido <sup>c</sup> (121 °C)	1,9	Mín. 1,5	Mín. 4,5	13,5
		Máx. 3,0	Máx. 14,0	32,0

<sup>a</sup> para  $1,0 \times 10^6$  a  $5,0 \times 10^6$  esporos/ carreador

<sup>b</sup> para  $1,0 \times 10^6$  a  $5,0 \times 10^7$  esporos/ carreador

<sup>c</sup> para  $1,0 \times 10^5$  a  $5,0 \times 10^6$  esporos/ carreador

## X.2.4. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO

### X.2.4.1. Responsabilidade do Fabricante

São responsabilidades do fabricante: determinação e fornecimento das características de desempenho do lote de indicador biológico por meio de certificado de análise que ateste a validade do desempenho declarado na embalagem do produto; definição do processo de esterilização para o qual o

indicador biológico é recomendado; caracterização de cada tipo de indicador biológico, usando condições padronizadas e equipamentos adequados; valor D e o método pelo qual este valor foi definido; contagem microbiana; estabilidade da resistência até a validade indicada no rótulo; condições de armazenagem, incluindo temperatura e umidade relativa; orientações sobre o meio de cultura a ser empregado e as condições de recuperação dos microrganismos após a exposição ao processo de esterilização e seu descarte

#### X.2.4.2. Responsabilidade do Usuário

##### - Produtos Comerciais

Quando um indicador biológico é adquirido comercialmente, sua adequação para uso em um processo de esterilização deve ter sido estabelecida em estudos, a não ser que existam dados disponíveis para confirmar o emprego do indicador em um processo específico. O usuário deve estabelecer dentro de sua instituição, os critérios de aceitação para os lotes do indicador biológico. Ao adquirir um indicador biológico, este deve vir acompanhado de um certificado emitido para cada lote. Se o indicador biológico for empregado de forma diferente daquela indicada pelo fabricante, o usuário deve proceder ao registro das condições de uso, das verificações e do desempenho do indicador biológico.

Após o recebimento de um lote de indicador biológico, o usuário deve quantificar a carga de esporos por unidade e proceder à verificação da morfologia e pureza dos microrganismos, confirmando pelo menos o gênero do microrganismo. As informações referentes ao valor D, às condições de armazenagem, ao prazo de validade e à estabilidade do indicador biológico devem ser observadas e registradas. O usuário pode considerar a necessidade de auditar o valor D antes da aceitação do lote de indicador biológico. Para armazenamento por longo período, é importante verificar o valor D e a estabilidade da contagem. No caso de armazenamento da suspensão de esporos, por período superior a 12 meses, sob condições documentadas, a confirmação da contagem e a comprovação da resistência dos esporos devem ser realizadas, a menos que o desempenho de uma cultura anterior tenha sido validado após longo período de armazenamento. Os resultados dos ensaios de resistência e contagem de esporos devem estar dentro da faixa de aceitação estabelecida durante a aprovação do lote de suspensão de esporos.

##### - Produtos não comerciais

O usuário pode decidir cultivar microrganismos para desenvolvimento de indicadores biológicos a serem empregados no desenvolvimento ou na validação de um processo de esterilização. No caso do usuário tornar-se um produtor, as exigências de desempenho do indicador biológico devem ser satisfeitas. Se um sistema de indicador biológico for empregado para o desenvolvimento de um novo processo de esterilização ou validação de um processo já existente, os mesmos critérios de desempenho para produtos comerciais devem ser cumpridos.

#### X.2.4.3- Preparação da Suspensão de Esporos

Os registros da identificação das suspensões de esporos devem ser mantidos por produtores comerciais ou não comerciais e devem incluir informações sobre a fonte da cultura inicial de microrganismos; a identificação; a rastreabilidade da cultura-mãe de esporos, a frequência de subcultura; o meio de cultura utilizado para a esporulação; as mudanças ocorridas na preparação do meio; as observações sobre contaminação da suspensão; os dados anteriores e posteriores ao choque térmico; os registros do uso da suspensão de esporos e a resistência à esterilização (particularmente, valores D e z, onde aplicável).

#### X.2.5. USO DE INDICADOR BIOLÓGICO PARA VALIDAÇÃO

Independente do processo de esterilização a ser empregado, a população inicial de microrganismos, a sua resistência ao processo esterilizante e o local de inoculação do produto podem influenciar a taxa de inativação do indicador biológico. Durante o processo de validação, vários locais do produto devem ser inoculados com o indicador biológico, garantindo o desafio tanto da embalagem quanto do produto nela contido, para que se possa garantir um nível de garantia de esterilidade de  $10^{-6}$  para o produto e para a embalagem. Pode ser necessário, por meio de estudos laboratoriais, determinar se os componentes do produto são mais difíceis de esterilizar do que, por exemplo, uma solução ou medicamento nele contido. A fase de qualificação de desempenho do produto deve identificar os parâmetros mais importantes do processo para inativação dos microrganismos nos locais mais difíceis de esterilizar. A sobrevivência do indicador biológico é consequência da resistência e tamanho da população microbiana. Portanto, nem sempre um indicador biológico com população de  $10^6$  é necessário para confirmar um nível de garantia de

esterilidade de  $10^6$ . O uso apropriado dos indicadores biológicos é para confirmar que os parâmetros estabelecidos no processo de esterilização garantem o nível de segurança de esterilidade desejado. Na esterilização por calor úmido, o emprego do indicador biológico confirma a letalidade determinada por parâmetros físicos. Indicadores biológicos com valor D relevante e populações substancialmente menores que  $10^6$  são adequados para validar muitos processos de esterilização e descontaminação. É importante que os usuários estejam capacitados para justificar cientificamente a escolha de um indicador biológico.

### X.3 PROCESSO ASSÉPTICO

Embora a esterilização terminal de um produto embalado seja o procedimento que garanta riscos mínimos de contaminação microbiana na produção de um lote, existem classes de produtos que não podem ser esterilizados no seu acondicionamento final e que devem ser preparados empregando processo asséptico. Este processo é projetado de forma a prevenir a contaminação dos componentes estéreis por microrganismos viáveis, ou ainda, na fase intermediária da produção, quando algum componente deve ser fornecido isento de microrganismos. Um produto definido como processado assepticamente consiste de componentes que foram esterilizados por um dos processos de esterilização como, por exemplo, a filtração, no caso de tratar-se de um líquido. No caso de material de acondicionamento constituído por vidro, pode ser empregado o calor seco e, quando se tratar de material de acondicionamento polimérico, como tampas, pode ser utilizada a autoclavação ou óxido de etileno.

No processo asséptico, o ambiente onde os insumos são manipulados e a etapa de enchimento asséptico são considerados pontos críticos. As exigências para um projeto adequado validado e que mantenha as condições necessárias para o processo asséptico abrangem um ambiente livre de microrganismos viáveis, onde a qualidade do ar seja garantida por equipamentos adequados, por pessoal treinado e paramentado de acordo com as exigências do ambiente e por operação a ser realizada. O ambiente desejado pode ser obtido por meio da tecnologia de filtração do ar que propicia o fornecimento do ar com a qualidade microbiana exigida. O planejamento da planta deve proporcionar um sistema de cascata de fluxo de ar com pressão positiva maior, das áreas mais críticas (assépticas) para aquelas de exigência intermediária (áreas de preparação) e finalmente, aquelas de menor exigência de controle; e ainda, deve permitir a troca freqüente do ar, além do emprego de fluxo de ar unidirecional na vizinhança imediata do produto ou componentes expostos e o controle da temperatura e umidade (quando aplicável). As instalações devem incluir sistemas de isolamento primário (próximo ao produto) e secundário (onde o processo asséptico é realizado) através de barreiras físicas. As superfícies, como paredes e teto, devem ser lisas permitindo a sanitização freqüente. Os vestiários devem ter espaço adequado para o pessoal e armazenamento das vestimentas estéreis. O treinamento do pessoal, quanto à paramentação, deve abranger o uso correto das vestimentas como, macacões, luvas e outros itens que propiciem a cobertura da superfície do corpo. Todo o processo de sanitização deve ser documentado. A certificação e a validação do processo e instalações assépticas são realizadas por meio da confirmação da eficiência dos sistemas de filtração, pelos procedimentos de monitoramento microbiológico do ambiente e pela simulação de enchimento asséptico do produto, empregando meio de cultura estéril. O monitoramento da instalação asséptica deve incluir o exame periódico de filtro ambiental, o monitoramento de rotina de material particulado e viável e o enchimento simulado com meio de cultura estéril.

### X.4. SALAS LIMPAS E AMBIENTES CONTROLADOS ASSOCIADOS

Esta seção apresenta questões relacionadas ao processamento asséptico de produtos com o estabelecimento, manutenção e controle da qualidade microbiológica de salas e zonas limpas. Inclui a classificação desses ambientes controlados com base nos limites de contagem de partículas; no programa de avaliação microbiológica para ambientes controlados; no treinamento de funcionários; nos fatores críticos no projeto e implementação de um programa de avaliação microbiológica; no desenvolvimento de um plano de amostragem; no estabelecimento de níveis microbiológicos de alerta e ação; nas metodologias e equipamentos usados para amostragem microbiológica; nos meios de cultura e diluentes usados; na identificação de isolados microbiológicos e na avaliação operacional por meio do envase de meio de cultura (*media fill*).

**Media fill** é um teste para simulação das operações assépticas em que o produto é substituído por um meio de cultura e serve para assegurar que os processos utilizados são capazes de produzir produtos estéreis.

Há métodos alternativos para avaliar e controlar o estado microbiológico de salas e zonas limpas, com variedade de equipamentos e métodos para amostragem microbiológica. A aplicação imprópria de amostragem e análises microbiológicas pode causar variabilidade significativa e potencial para

contaminação inadvertida. Meios de cultura, dispositivos de amostragem e métodos aqui mencionados servem como referência.

Um grande número de produtos estéreis é fabricado por processamento asséptico, que depende da exclusão de microrganismos da linha de processamento e, portanto, a prevenção da entrada dos microrganismos em recipientes abertos durante o envase e a carga microbiana do produto e do ambiente de fabricação são fatores importantes relacionados ao nível de garantia de esterilidade destes produtos.

#### X.4.1. CLASSIFICAÇÃO DE SALAS LIMPAS E AMBIENTES CONTROLADOS ASSOCIADOS

Sala limpa é a sala na qual a concentração de partículas em suspensão no ar é controlada; é construída e utilizada de maneira a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas dentro da sala, na qual outros parâmetros relevantes, como, por exemplo, temperatura, umidade e pressão, são controlados conforme necessário. A classificação de limpeza do ar de salas e zonas limpas, por meio da análise de concentração de partículas em suspensão no ar, é regulada pela norma ABNT NBR ISO 14644-1 – Salas limpas e ambientes controlados associados – Parte 1: classificação da limpeza do ar. Este documento se aplica a partículas suspensas no ar dentro de um ambiente controlado, mas não pretende caracterizar a natureza viável ou não viável das partículas.

A aplicação dessa norma tem sido usada por fabricantes de salas e zonas limpas para orientar a construção, a preparação e a manutenção destas instalações. Contudo, não fornece relação entre o número de partículas não viáveis e a concentração de microrganismos viáveis.

A indústria farmacêutica se preocupa com a contagem de partículas viáveis e, no caso de produtos injetáveis, há preocupação adicional com a contagem de partículas totais. A justificativa de que, quanto menor o número de partículas presentes em uma sala limpa, menos provável que microrganismos carregados pelo ar estejam presentes, é aceitável e orientativo no projeto, na construção e na operação de salas e zonas limpas.

A Tabela 2 descreve as classes de limpeza de ar de acordo com a norma ABNT NBR ISO 14644-1, que está baseada em limites de partículas com tamanhos de 0,1 a 5µm. A Tabela 3 mostra a relação entre os diferentes sistemas de classificação de salas limpas.

É aceitável que, se um menor número de partículas estiverem presentes na sala limpa ou ambiente controlado, a contagem microbiana sob condições operacionais será menor, desde que não haja mudanças no fluxo de ar, na temperatura e na umidade. Salas limpas são mantidas sob um estado de controle operacional com base em dados dinâmicos (operacionais).

**Tabela 2.** Classes de limpeza do ar para partículas em suspensão, selecionadas para salas e zonas limpas

Número de Classificação ISO (N)	Limites máximos de concentração (partículas/m <sup>3</sup> de ar) para partículas iguais ou maiores que os tamanhos considerados					
	0,1µm	0,2µm	0,3µm	0,5µm	1µm	5µm
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

**Tabela 3.** Comparação entre os diferentes sistemas de classificação de limpeza de ar.

OMS e EEC (GMP)	Estados Unidos (habitual)	ISO
Classe A	Classe 100	ISO 5

Classe B	Classe 100	ISO 5
Classe C	Classe 10.000	ISO 7
Classe D	Classe 100.000	ISO 8

#### X.4.2. PROGRAMA DE AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA PARA SALAS LIMPAS E AMBIENTES CONTROLADOS ASSOCIADOS

O monitoramento de partículas totais em suspensão no ar em salas e zonas limpas não fornece informação sobre o conteúdo microbiológico do ambiente. A limitação básica dos contadores de partículas é que normalmente medem partículas de 0,5µm ou maiores e os microrganismos carregados pelo ar não são células que flutuam livremente, não estão sozinhas e freqüentemente se associam com partículas de 10 a 20µm. Contagens de partículas, bem como, contagens microbianas dentro de salas e zonas limpas, variam com as atividades conduzidas durante a amostragem e a sua localização. O monitoramento do ambiente para partículas não viáveis e microrganismos é importante porque ambos são necessários para alcançar as exigências relativas ao material particulado e esterilidade estabelecidas para os produtos..

Programas de monitoramento microbiológico para salas e zonas limpas devem avaliar a efetividade das práticas de limpeza e desinfecção que podem ter impacto sobre a carga microbiana do ambiente. O monitoramento microbiológico normalmente não identifica e quantifica todos os contaminantes microbianos presentes nos ambientes; porém, o monitoramento de rotina deve fornecer informação suficiente para se certificar de que o ambiente esteja operando dentro do estado de controle adequado.

O monitoramento microbiológico ambiental e a análise de dados realizados por pessoas qualificadas permitem que o estado de controle seja mantido em salas e zonas limpas. O ambiente deve ser amostrado durante operações normais para permitir a coleta de dados significativos e a amostragem microbiana deve ocorrer quando os materiais estiverem na área, as atividades de processamento estiverem ocorrendo e todos os funcionários estiverem em operação no local.

O monitoramento microbiológico de salas e zonas limpas deve incluir a avaliação microbiológica ambiental,, do ar comprimido que entra na área crítica, das superfícies, dos equipamentos, dos recipientes, dos pisos, das paredes e das vestimentas das pessoas. O objetivo do programa é obter estimativas representativas da carga microbiana do ambiente e, uma vez compilados e analisados, quaisquer tendências devem ser avaliadas por pessoas treinadas. É importante rever resultados ambientais com base em freqüência especificada, bem como rever resultados por períodos prolongados para determinar se há tendências presentes. Tendências podem ser visualizadas através de quadros de controle estatístico que incluem níveis de alerta e de ação. O controle microbiológico de ambientes controlados também pode ser avaliado com base nos dados de tendência. Relatórios ou resumos periódicos devem ser emitidos para alertar o responsável pela área.

Quando o nível microbiológico especificado para um ambiente controlado for excedido, uma revisão da documentação e investigação deve ocorrer. A investigação deve incluir a revisão da documentação de manutenção da área; da documentação de desinfecção; dos parâmetros físicos ou operacionais inerentes, tais como, mudanças na temperatura ambiental e umidade relativa e o estágio de treinamento dos funcionários envolvidos. Em seguida à investigação, as ações adotadas podem incluir o reforço no treinamento das pessoas para enfatizar o controle microbiológico do ambiente; a amostragem adicional em freqüência aumentada; a desinfecção adicional; os testes adicionais de produto; a identificação do contaminante microbiano e sua possível fonte e a reavaliação e revalidação dos atuais procedimentos operacionais padronizados, se necessário. Com base na revisão da investigação e nos resultados dos testes, o significado do nível microbiológico excedido e a aceitabilidade das operações ou produtos processados sob aquela condição podem ser definidos. Toda investigação e justificativa das ações devem ser documentadas e fazer parte do sistema de gerenciamento da qualidade.

Sala e zona limpa são definidas por certificação de acordo com a norma aplicável, sendo que os parâmetros avaliados incluem integridade de filtros, diferenciais de pressão e velocidade, padrões e mudanças do ar. Um exemplo de método para conduzir o teste de desafio de partículas para o sistema consiste em aumentar a concentração de partículas no ambiente através de fumaça no entorno de áreas de trabalho críticas e visualizar os movimentos do ar. A presença de vórtices e zonas turbulentas podem ser visualizadas e o padrão de fluxo de ar pode ser finamente ajustado para eliminar ou minimizar efeitos indesejáveis. Esta avaliação é feita sob condições de produção simuladas; porém, com equipamentos e funcionários no local.

O teste e a otimização apropriados das características físicas da sala limpa ou ambiente controlado são essenciais antes da conclusão da validação do programa de monitoramento microbiológico. A garantia

de que o ambiente está operando adequadamente e de acordo com suas especificações dará maior garantia de que a carga microbiana do ambiente será apropriada para processamento asséptico. Esses testes devem ser repetidos durante a certificação de rotina da sala ou zona limpa e sempre que alterações consideradas significativas forem feitas na operação, tais como, mudanças no fluxo de pessoas, processamento, operação, fluxo de material, sistemas de manipulação de ar ou layout de equipamentos.

#### X.4.3. TECNOLOGIAS ALTERNATIVAS PARA PROCESSO ASSÉPTICO

Devido à forte correlação entre o envolvimento e intervenção humanos e o risco potencial para contaminação de produto no envase asséptico, sistemas de produção onde pessoas são removidas das zonas críticas têm sido implementados, empregando, portanto, estratégias avançadas de processamento asséptico, com requisitos reduzidos de monitoramento ambiental de partículas viáveis e não-viáveis.

Seguem algumas definições de sistemas usados para reduzir a taxa de contaminação no processo asséptico:

**Barreiras:** dispositivo que restringe o contato entre o operador e o campo asséptico fechado pela barreira. Barreiras não podem ser esterilizadas e nem sempre possuem sistemas de transferência que permite a passagem de materiais para dentro ou fora do sistema sem exposição ao ambiente ao redor. Há diferentes tipos de barreiras, desde cortinas de plástico em zonas críticas até barreiras rígidas em equipamentos, que podem incorporar elementos como suporte de luvas e porta de transferência.

**Sopro/Enchimento/Selagem (*Blow/Fill/Seal*):** este sistema combina o sopro do recipiente com o envase do produto e a selagem em um único equipamento. Do ponto de vista microbiológico, a sequência de formação do recipiente, envase do produto estéril e a formação e aplicação do selo são obtidos assepticamente em uma operação ininterrupta com exposição mínima ao ambiente. Estes sistemas existem há muitos anos e mostram taxas de contaminação menores que 0,1%.

**Isoladores:** tecnologia usada para dupla proposta, de proteger o produto da contaminação do ambiente e pessoas durante envase e fechamento e de proteger pessoas de produtos tóxicos ou deletérios durante sua produção. Esta tecnologia é baseada no princípio de colocar materiais previamente esterilizados, como recipientes, produtos e tampas, em um ambiente estéril, que permanecem estéreis durante toda operação, uma vez que pessoas ou componentes não-estéreis não estão dentro do isolador. A barreira do isolador é uma barreira absoluta que não permite trocas entre ambientes protegidos e não-protégidos. Isoladores podem ser fisicamente selados contra a entrada de contaminantes externos ou pode ser efetivamente selados pela aplicação contínua de sobrepressão. Manipulação de material por funcionários é realizada através de luvas ou vestimentas completas ou parciais. O ar que entra no isolador passa através de um filtro HEPA ou ULPA e a exaustão de ar normalmente passa por um filtro HEPA. Vapor de peróxido de hidrogênio ou ácido peracético normalmente são usados para esterilização das superfícies ou ambiente interno. A esterilização do interior dos isoladores e todo conteúdo são normalmente validados para um nível de garantia de esterilidade de  $10^{-6}$ .

A introdução de equipamentos, componentes e materiais pode ser feita de diversas maneiras, como uso de autoclave de porta dupla, introdução contínua de componentes através de uma esteira que passa por túnel de esterilização ou uso de um sistema de doca. É necessário monitorar a integridade, calibração e manutenção do isolador.

Os requisitos para os ambientes controlados adjacentes a estas novas tecnologias usadas no processamento asséptico dependem do tipo de tecnologia usada.

Equipamentos de Sopro/Enchimento/Selagem que limitam o contato do operador com o produto podem ser instalados em um ambiente controlado, especialmente se alguma intervenção do operador é possível durante a produção.

Sistemas de barreiras requerem alguma forma de ambiente controlado. Em função dos numerosos tipos e aplicações, os requisitos para o ambiente adjacente podem variar. As estratégias de desenho e operação para o ambiente onde circulam estes sistemas devem ser desenvolvidas pelos produtores usando um critério lógico e racional e a capacidade do sistema de fornecer produtos estéreis deve ser validada de acordo com critérios pré-estabelecidos.

Em isoladores, o ar entra através dos filtros integrais de qualidade HEPA, ou melhor, e seu interior é tipicamente esterilizado com um nível de garantia de esterilidade de  $10^{-6}$ . Portanto, isoladores que contêm ar estéril não trocam ar com o ambiente ao redor e são livres de operadores humanos. Entretanto, quando o

isolador está em um ambiente controlado, o potencial de produto contaminado é reduzido na eventualidade de um vazamento nas luvas ou vestimentas.

A extensão e escopo do monitoramento microbiológico ambiental dependem do sistema utilizado. Produtores devem balancear a frequência da amostragem ambiental que requer intervenção humana, com os benefícios acumulados pelos resultados do monitoramento. Uma vez que barreiras são desenhadas para reduzir a intervenção humana, sistemas de amostragem remotos devem ser usados em substituição a intervenção de pessoas. Em geral, uma vez que a validação estabeleceu a eficácia da barreira, a frequência de amostragem para monitorar o estado microbiológico da área de processamento asséptico pode ser reduzida quando comparada à frequência de um sistema clássico de processo asséptico.

Sistemas de isoladores requerem frequência menor de monitoramento microbiológico. O monitoramento contínuo de partículas totais pode fornecer garantia de que o sistema de filtração de ar dentro do isolador está funcionando adequadamente. Métodos tradicionais para amostragem microbiológica quantitativa do ar podem não ser suficientes para testar o ambiente dentro do isolador. Experiências com isoladores indicam que, sob condições normais de operação, vazamento ou rompimento nas luvas representam o maior potencial para contaminação microbiológica, o que requer testes frequentes de integridade das luvas e monitoramento das superfícies das luvas. O monitoramento não frequente de superfícies dentro do isolador deve ser avaliado e pode ser benéfico.

#### X.4.4. TREINAMENTO DE FUNCIONÁRIOS

Produtos processados assepticamente exigem muita atenção aos detalhes, disciplina rigorosa e supervisão estrita das pessoas, a fim de manter o nível de qualidade ambiental apropriado para a garantia de esterilidade do produto final.

O treinamento de todos os funcionários que trabalham em salas e zonas limpas é crítico. Este treinamento também é importante para as pessoas responsáveis pelo programa de monitoramento microbiológico, uma vez que a contaminação da área de trabalho pode ocorrer inadvertidamente durante a amostragem microbiológica, por uso de técnicas impróprias. Em operações altamente automatizadas, o monitoramento pode ser realizado por pessoas que têm contato mais direto com zonas críticas dentro da área de processamento. O monitoramento dos funcionários deve ser conduzido antes e depois do trabalho na área de processamento.

O gerenciamento da instalação deve garantir que todas as pessoas envolvidas em operações nas salas e zonas limpas conheçam princípios microbiológicos relevantes, incluindo princípios básicos do processamento asséptico e a relação dos procedimentos de fabricação e manipulação com fontes potenciais de contaminação do produto. Também devem ter conhecimento sobre princípios básicos de microbiologia; fisiologia microbiana; desinfecção e limpeza; seleção e preparação de meios de cultura; taxonomia e esterilização, de acordo com o envolvimento dos funcionários no processo. As pessoas envolvidas na identificação microbiana requerem treinamento especializado nos métodos laboratoriais aplicáveis. Treinamento adicional no gerenciamento dos dados ambientais coletados deve ser fornecido. Conhecimento e compreensão dos procedimentos operacionais padrão aplicáveis são críticos, especialmente aqueles relacionados com as medidas corretivas que são tomadas quando as condições ambientais exigirem. A compreensão das políticas de adesão às exigências regulatórias e a responsabilidade de cada indivíduo relativas às boas práticas de fabricação devem ser parte integrante do programa de treinamento, bem como treinamento sobre como conduzir investigações e analisar dados.

O controle da contaminação microbiana associada com as pessoas é um dos elementos mais importantes do programa de controle ambiental. A contaminação pode ocorrer a partir da disseminação de microrganismos por indivíduos, particularmente aqueles com infecções ativas e, portanto, apenas indivíduos saudáveis devem ser autorizados a acessar ambientes controlados. A boa higiene pessoal e atenção cuidadosa nos detalhes dos procedimentos de paramentação asséptica são itens importantes. Os funcionários apropriadamente paramentados devem ser cuidadosos em manter a integridade de suas luvas e aventais durante todo o período de permanência nos ambientes controlados.

Como o programa de monitoramento ambiental não é capaz de detectar todos os eventos do processamento asséptico que poderiam comprometer a qualidade microbiológica do ambiente, estudos periódicos de envase de meio de cultura ou simulação de processo são necessários para garantir que os controles operacionais apropriados e treinamento sejam efetivamente mantidos.

#### X.4.5. PROJETO E IMPLANTAÇÃO DO PROGRAMA DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL



É responsabilidade do fabricante, desenvolver, iniciar, implantar e documentar um programa de monitoramento microbiano ambiental que seja capaz de detectar um curso adverso nas condições microbiológicas a tempo de permitir ações corretivas significativas e efetivas. É imperativo que o programa seja feito sob medida para as condições e instalações específicas.

Um meio de cultura de crescimento microbiológico geral como o meio de digestão de caseína de soja, deve ser adequado na maioria dos casos. Este meio pode ser suplementado com aditivos para contornar ou minimizar os efeitos dos agentes desinfetantes ou de antibióticos, se usados ou processados nestes ambientes. A detecção e quantificação de leveduras e fungos devem ser consideradas. Meios geralmente aceitos são tais como sabouraud, sabouraud modificado ou ágar inibidor de fungos. Outros meios validados para promover o crescimento de fungos podem ser usados, tal como Agar digestão caseína de soja. Em geral, a análise de anaeróbios obrigatórios não é realizada na rotina, a não ser que condições ou investigações exijam. A capacidade dos meios de cultura selecionados para detectar e quantificar os microrganismos anaeróbios ou micro-aerófilos deve ser avaliada.

A seleção de tempo e temperatura de incubação é feita uma vez que os meios apropriados tenham sido selecionados. Tipicamente, temperaturas de incubação nos intervalos de  $22,5 \pm 2,5$  °C e  $32,5 \pm 2,5$  °C têm sido usadas com tempos de incubação de 72 e 48h, respectivamente. Os processos de esterilização usados para preparar meios de cultura para o programa ambiental devem ser validados e devem ser examinados para esterilidade e promoção de crescimento. Os meios devem ser capazes de manter o crescimento quando inoculados com menos de 100 UFC.

O programa de controle ambiental deve incluir identificação e avaliação dos locais de amostragem e validação dos métodos de amostragem microbiológica do ambiente.

#### X.4.6. PLANO E LOCAIS DE AMOSTRAGEM

Durante a fase inicial ou preparação de uma sala limpa ou outro ambiente controlado, locais específicos para amostragem de ar ou de superfícies devem ser determinados. Deve-se considerar a proximidade do produto e se o ar e as superfícies estão em contato com um produto ou superfícies sensíveis dos sistemas de fechamento dos recipientes. Tais áreas devem ser consideradas críticas, requerendo mais monitoramento do que as áreas sem contato com o produto. Em uma operação de envase de produto parenteral, áreas de operação incluiriam tipicamente o fornecimento de tampas para o recipiente, rotas dos recipientes abertos e outros objetos inanimados que os funcionários manipulam rotineiramente.

A frequência de amostragem dependerá da criticidade dos locais especificados e o tratamento subsequente recebido pelo produto depois de ter sido assepticamente processado.

À medida que intervenções manuais durante a operação e o potencial de contato pessoal com o produto aumentam, a importância relativa do programa de monitoramento ambiental também aumenta. O monitoramento ambiental é mais crítico para produtos que são processados assepticamente do que para produtos que sofrem esterilização terminal. A determinação e quantificação de microrganismos resistentes ao tratamento de esterilização são mais críticas do que o monitoramento microbiológico dos ambientes circundantes de fabricação. Se o ciclo de esterilização terminal não se basear no conceito do ciclo de sobremorte, o valor do programa de carga microbiana anterior à esterilização é crítico. Os planos de amostragem devem ser dinâmicos com frequências de monitoramento e localizações ajustados com base no desempenho de tendência. É apropriado aumentar ou diminuir a amostragem com base neste desempenho.

#### X.4.7. LIMITES MICROBIOLÓGICOS DE ALERTA E AÇÃO EM SALAS E ZONAS LIMPAS

Os princípios e conceitos de controle de processos estatísticos são úteis para estabelecer níveis de alerta e ação e para reagir a tendências.

O nível de alerta no monitoramento microbiológico ambiental é aquele nível de microrganismos que mostra um significado potencial a partir de condições de operação normais. Exceder o nível de alerta não é necessariamente a base para a ação corretiva definitiva, porém deve pelo menos levar a uma investigação de acompanhamento documentada que pode incluir modificações no plano de amostragem.

O indicativo de ação em monitoramento microbiológico ambiental é aquele nível de microrganismos que quando excedido requer acompanhamento imediato e, se necessário, ação corretiva.

Níveis de alerta se baseiam normalmente em informações históricas obtidas de operações de rotina do processo em um ambiente controlado específico.

Em uma instalação nova, estes níveis geralmente se baseiam na experiência anterior de instalações e processos similares; e, dados obtidos no decorrer de várias semanas. Esses níveis são normalmente re-examinados para adequação a uma frequência estabelecida. Quando os dados históricos demonstram condições melhoradas, estes níveis podem ser modificados para refletir as condições. Tendências que mostram uma deterioração da qualidade ambiental requerem atenção para determinar a causa atribuível e para instituir um plano de ação corretiva, a fim de trazer as condições de volta aos níveis esperados. Contudo, uma investigação deve ser implementada, e uma avaliação do impacto potencial sobre o produto deve ser feita.

#### X.4.8. METODOLOGIAS E EQUIPAMENTOS USADOS PARA MONITORAMENTO AMBIENTAL

Microrganismos viáveis no ar podem influenciar a qualidade microbiológica dos produtos fabricados em salas e zonas limpas. A quantificação destes microrganismos pode ser afetada por instrumentos e procedimentos utilizados para realizar os ensaios e sempre que métodos ou equipamentos alternativos são utilizados deve-se verificar a equivalência geral dos resultados obtidos.

Há diferentes formas de monitoramento de tipos de equipamentos disponíveis para quantificar microrganismos viáveis, incluindo amostradores de sedimentação, de impacto e centrífugos. A seleção e adequação do método a ser utilizado é responsabilidade do usuário.

O método que utiliza as placas de sedimentação é amplamente utilizado, simulando a exposição do produto à contaminação ambiental, tendo como vantagens simplicidade operacional e baixo custo. Fornece informações qualitativas sobre o ambiente de exposição por tempo prolongado, porém, não permite a avaliação quantitativa dos níveis de contaminação microbiana de ambientes críticos.

Na monitoração ativa emprega-se amostradores de ar mecânicos nos quais a limitação é o tamanho da amostra de ar que está sendo testada, pois o nível de microrganismos no ar de um ambiente controlado é normalmente reduzido e um grande volume de ar deve ser testado para que o resultado seja preciso e exato, o que muitas vezes não é prático. Para demonstrar que as contagens microbianas presentes no ambiente não estão aumentando depois da amostragem, a mesma pode ser estendida para determinar se o tempo de amostragem é um fator limitante para obter uma amostra representativa. Há equipamentos capazes de amostrar altas taxas de volume de ar, mas deve-se considerar a ruptura do fluxo de ar em áreas críticas ou a criação de turbulência que possam aumentar a probabilidade de contaminação.

Amostradores centrífugos demonstram seletividade para partículas maiores e, portanto, o uso destes equipamentos pode resultar em contagens maiores de partículas no ar. Ao usar estes amostradores, deve-se considerar seu efeito na linearidade do fluxo de ar na zona controlada onde é posicionado para a amostragem. A utilização de sondas remotas requer que seja determinado se o tubo extra usado não tem efeito adverso na contagem de partículas viáveis, pois este efeito deve ser eliminado, ou um fator de correção deve ser usado para os resultados obtidos.

#### X.4.9. METODOLOGIAS E EQUIPAMENTOS USADOS PARA MONITORAMENTO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS EM SUPERFÍCIES

A amostragem de superfícies de equipamentos, de áreas e de funcionários é um componente do programa de controle microbiológico de ambientes controlados. Para minimizar a ruptura de operações críticas, normalmente a amostragem é realizada no final das operações. A amostragem pode ser feita usando placas de contato ou *swab*.

O monitoramento é realizado normalmente nas áreas que entram em contato com o produto e em áreas adjacentes. Placas de contato com ágar nutriente são usadas para amostrar áreas planas e são incubadas em temperatura adequada para quantificação de partículas viáveis. Ágar específico pode ser usado para quantificar fungos, esporos, etc. O *swab* é empregado em superfícies irregulares, especialmente em equipamentos. O *swab* é colocado em um diluente adequado e a estimativa de contagem microbiana é feita plaqueando uma alíquota apropriada em agar nutriente específico. A área a ser amostrada usando *swab* é definida usando um molde de tamanho apropriado estéril, em geral entre 24 a 30 cm<sup>2</sup>. O resultado é dado por placa de contato ou por *swab*.

#### X.4.10. MEIOS DE CULTURA E DILUENTES PARA AMOSTRAGEM E QUANTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS VIÁVEIS

Os meios de cultura e diluentes usados para amostragem e quantificação de microrganismos em salas e zonas limpas dependem dos procedimentos e equipamentos usados. O ágar caseína de soja é o meio sólido normalmente usado, mas há diferentes meios e diluentes disponíveis para diferentes propostas. Meios alternativos devem ser validados para a proposta usada. Quando se usa desinfetantes ou antibióticos na área controlada, deve-se considerar o uso de meios com agentes inativantes apropriados.

#### X.4.11. IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS MICROBIANOS

O programa de controle ambiental inclui um nível apropriado de identificação da flora obtida na amostragem. O conhecimento da flora normal das salas e zonas limpas é importante para definir o monitoramento da área e métodos de recuperação e para avaliar a eficácia dos métodos, procedimentos e agentes de limpeza e desinfecção. A informação obtida pelo programa de identificação pode ser útil na investigação de fontes de contaminação, especialmente quando os limites de ação são excedidos. A identificação de microrganismos isolados de áreas críticas é importante.

#### X.4.12. AVALIAÇÃO OPERACIONAL DO ESTADO MICROBIOLÓGICO DE PRODUTOS ENVASADOS ASSEPTICAMENTE

Salas e zonas limpas são monitoradas por um programa de monitoramento ambiental apropriado. Para garantir carga microbiana mínima, informação adicional na avaliação do estado microbiológico do ambiente pode ser obtida por meio do teste de envase asséptico de meio de cultura (*media fill*). O teste de *media fill* é empregado para avaliar o processamento asséptico usando meio de cultura estéril no lugar do produto. Resultados satisfatórios de *media fill* demonstram a adequação da linha para a fabricação do produto. Um *media fill* aceitável demonstra a adequação da da linha para a fabricação do produto.. Entretanto, outros fatores são importantes, como construção das áreas, monitoramento ambiental e treinamento de pessoas.

Quando um processo asséptico é desenvolvido e instalado, é necessário qualificar o estado microbiológico do processo, realizando no mínimo 3 *media fill* consecutivos. Os problemas no desenvolvimento do programa de *media fill* a serem considerados compreendem procedimentos do envase do meio; seleção do meio; volume de envase; tempo e temperatura de incubação; inspeção de unidades envasadas; interpretação de resultados e possíveis ações corretivas requeridas.

Uma vez que o *media fill* é realizado para simular o processamento asséptico de um produto, é importante que seja realizado em condições normais de produção. Isto inclui número máximo de pessoas e uso de todas as etapas e materiais usados no processo de produção normal. Durante a condução do *media fill*, intervenções pré-documentadas conhecidas devem ser planejadas durante as corridas normais de produção, como troca de bicos de envase, componentes de fixação, etc. Alternativamente, para adicionar uma margem de segurança, uma combinação de condições possíveis pode ser usada e exemplos incluem paradas freqüentes; reparos não esperados; troca de filtros, etc.

A qualificação de um processo asséptico deve ser feita para todos os produtos e para cada linha. Desde que a geometria do recipiente (como tamanho e abertura) e a velocidade da linha sejam fatores que são variáveis. A combinação apropriada destes fatores, preferencialmente nos extremos, devem ser usados na qualificação. Uma análise racional dos produtos usados deve ser documentada.

Recomenda-se que o *media fill* seja realizado para cobrir todos os turnos de produção para linha/produto/combinações de recipientes para qualificação inicial e revalidações periódicas. O programa de *media fill* deve simular práticas de produção em tempos prolongados e pode ser realizado no final do turno de produção.

Meios de cultura ricos podem ser usados, como caldo de soja caseína. Após o processamento asséptico do meio de cultura, estes devem ser incubados a  $22,5 \pm 2,5$  °C ou  $32,5 \pm 2,5$  °C, por no mínimo 14 dias. Se duas temperaturas forem usadas para a incubação das amostras de meio de cultura, estes devem ser incubados no mínimo 7 dias em cada uma delas. Após incubação, as amostras devem ser inspecionadas para crescimento. Isolados devem ser identificados para gênero e, quando possível, para espécie a fim de propiciar a investigação das fontes de contaminação.

Pontos críticos na realização do *media fill* são número de recipientes para qualificar o processo asséptico, número de unidades enchidas para o *media fill*, interpretação de resultados e implementação de ações corretivas. Normalmente 3 corridas de *media fill* são usadas para qualificação inicial ou início de uma área para demonstrar consistência na linha de envase asséptico. O número mínimo para demonstrar a taxa

de contaminação de não mais que 0,1%, critério de aceitação para corrida de *media fill*, é de no mínimo 3.000 unidades. Plantas pilotos que preparam pequenos lotes podem usar número menor de unidades.

Uma vez que os funcionários são uma fonte crítica de contaminação em salas limpas, documentação visual pode ser útil para verificar correlação de atividades de produção com eventos de contaminação.

#### **X.5.PROCEDIMENTOS DE LIBERAÇÃO**

Deve ser estabelecido um programa de garantia da qualidade que descreva em detalhes os passos e a documentação requerida para a liberação da carga ou lote. A liberação dos produtos esterilizados dependerá de liberação convencional. A Farmacopéia Brasileira está comprometida a desenvolver trabalhos que disciplinem a questão da liberação paramétrica, devendo o assunto ser abordado em próximas edições.

#### **DOSEAMENTO DA HEPARINA NOS FATORES DA COAGULAÇÃO**

A heparina é dosada sob a forma de um complexo à antitrombina III (AT) via inibição da atividade do Fator Xa da coagulação. Na mistura reativa é mantido um excesso de AT para garantir uma concentração constante do complexo heparina-AT. O Fator Xa é neutralizado pelo complexo heparina-AT e o Fator Xa residual hidrolisa um substrato cromogênico peptídico específico libertando um cromóforo. A quantidade do cromóforo é inversamente proporcional à atividade da heparina.

**Substrato cromogênico para o Fator Xa.** Substrato cromogênico específico do Fator Xa tal como: o cloridrato de N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-glicil-L-arginina-4-nitro-anilida. Reconstitua de acordo com as instruções do fabricante.

**Tampão de diluição.** Solução de tris(hidroximetil)aminometano a 6,05 g/l. Se necessário, ajuste para pH 8,4 com ácido clorídrico.

**Solução problema.** Dilua a amostra com o tampão de diluição de modo a obter uma solução que supostamente contenha 0,1 U.I. de heparina por mililitro.

**Solução de referência.** Dilua a preparação de referência da heparina com o tampão de diluição de modo a obter uma solução que contenha 0,1 U.I. de heparina por mililitro. As condições descritas são aplicáveis às placas de microtitulação. Se o ensaio é realizado em tubos, ajuste os volumes de modo a manter as proporções na mistura. Pouco tempo antes do ensaio, colocar todas as soluções a 37°C em banho Maria. Distribua numa série de poços 20 µl de plasma humano normal e 20 µl de solução de antitrombina III. Juntar aos poços uma série de volumes (20 µl, 60 µl, 100 µl e 140 µl) da solução problema ou da solução de referência e completar o volume de cada poço com 200 µl utilizando o tampão de diluição (0,02-0,08 U.I. de heparina por mililitro na mistura reativa final).

**Método do ponto de equivalência.** Transfira 40 µl de cada poço para uma segunda série de poços, juntar 20 µl da solução do Fator Xa bovino e incubar a 37°C durante 30 segundos. Juntar 40 µl de solução do substrato cromogênico do Fator Xa a 1 mmol/l e incubar a 37°C, durante 3 min. Parar a reação diminuindo o pH com um reagente apropriado tal como uma solução a 20 % (V/V) de ácido acético glacial e meça a absorbância a 405 nm (V.2.14.). O tempo de reação é geralmente da ordem de 3 minutos a 15 minutos, mas são toleradas certas variações se elas permitirem melhorar a linearidade da curva dose/resposta.

**Método cinético.** Transfira 40 µl de cada poço para uma segunda série de poços, juntar 20 µl da solução bovina do Fator Xa e incubar a 37°C durante 30 segundos. Juntar 40 µl da solução do substrato cromogênico do Fator Xa a 2 mmol/l, incubar a 37°C e determinar a velocidade de clivagem do substrato procedendo à leitura contínua da variação de absorbância a 405 nm (V.2.14) permitindo, assim, calcular a velocidade inicial de clivagem do substrato. Esta velocidade deve ser proporcional à concentração residual do Fator Xa. Verificar a validade do ensaio e calcular a atividade da heparina da amostra pelos procedimentos estatísticos aplicáveis aos ensaios biológicos (VI.).

#### **DOSEAMENTO DOS FATORES DA COAGULAÇÃO ATIVADOS**

Se a amostra contiver heparina, determine a quantidade existente, como se indica no ensaio da Heparina (V.5.2.6.), e neutralize-a juntando sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutralizam 1 U.I. de heparina). Com a solução tampão de tris (hidroximetil) aminometano de pH 7,5, prepare diluições a 1/10 e 1/100. Coloque uma série de tubos de poliestireno em banho Maria a 37°C. Introduza em cada tubo

0,1 ml de plasma pobre em plaquetas e 0,1 ml de uma diluição apropriada de reagente de cefalina ou de uma preparação fosfolipídica que atue como substituto de plaquetas. Deixe em repouso durante 60 s e junte a cada tubo 0,1 ml de uma das diluições e para o tubo de ensaio em branco 0,1 ml da solução tampão.

Junte imediatamente a cada tubo 0,1 ml de uma solução de cloreto de cálcio a 3,7 g/l, previamente aquecida a 37°C, e determine o intervalo de tempo entre a adição da solução de cloreto de cálcio e a formação do coágulo, esta determinação é realizada nos 30 min que se seguem à primeira diluição. O ensaio só é válido se o tempo de coagulação do ensaio em branco for de 200 a 350 s.

## DOSEAMENTO DO FATOR II DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA

O doseamento do Fator II da coagulação humana é realizado após ativação específica em Fator IIa. O Fator IIa é calculado comparando a sua atividade em um substrato cromogênico peptídico específico com a mesma atividade do padrão internacional ou de uma preparação padrão calibrada em unidades internacionais (U.I.).

A Unidade Internacional do Fator II corresponde à atividade de uma dada quantidade do padrão internacional, que é constituído por um concentrado liofilizado do Fator II da coagulação sanguínea. A correspondência entre a Unidade Internacional e o padrão internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

O método de doseamento cromogênico inclui 2 etapas sucessivas: ativação do Fator II por ação do veneno de cobra; e a clivagem enzimática de um substrato cromogênico pelo Fator IIa que liberta um cromóforo quantificável por espectrofotometria. Em condições de doseamento apropriados, existe uma relação linear entre a atividade do Fator IIa e a clivagem do substrato cromogênico.

## REAGENTES

**Ativador específico do Fator II proveniente do veneno da víbora Ecarina.** Proteína obtida a partir do veneno da víbora *Echis carinatus* ativa especificamente o Fator II. Reconstituir a preparação seguindo as instruções do fabricante. Uma vez reconstituída, conservar a 4°C e utilizar no espaço de 1 mês.

**Substrato cromogênico para o Fator IIa.** Substrato cromogênico específico do Fator IIa como: dihidrocloridrato de H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida, 4-toluenosulfonil-glicil-prolil-L-arginina-4-nitroanilida, H-D- ciclohexilglicil- $\alpha$ -aminobutiril-L-arginina-4-nitroanilida, D-ciclohexilglicil-L-alanil-arginina-4-nitroanilida-diacetato. Reconstituir seguindo as instruções do fabricante.

**Tampão de diluição.** Solução contendo 6,06 g/l de tris(hidroximetil)aminometano, 17,53 g/l de cloreto de sódio, 2,79 g/l de ácido (etilenodinitrilo) ácido tetracético e 1 g/l de albumina bovina ou de albumina humana. Acertar, se necessário, o pH para 8,4 com ácido hidrocloreídrico.

## TÉCNICA

**Solução problema.** Diluir a amostra no tampão de modo a obter uma solução contendo 0,015 U.I. de Fator II por mililitro. Preparar, pelo menos, mais 3 diluições desta solução no tampão de diluição.

**Solução padrão.** Diluir a solução padrão no tampão de modo a obter uma solução contendo 0,015 U.I. de Fator II por mililitro. Preparar, pelo menos, mais 3 diluições desta solução no tampão de diluição.

Colocar todas as soluções a 37°C num banho-maria, pouco tempo antes do ensaio.

As condições descritas aplicam-se às placas de microtitulação. Se o doseamento é realizado em tubos, ajustar os volumes de modo a manter as proporções na mistura. Introduzir 25  $\mu$ l das diferentes diluições da amostra e da solução padrão, numa série de poços da placa de microtitulação mantida a 37°C. Juntar em cada poço 125  $\mu$ l do tampão de diluição e 25  $\mu$ l de Ecarina e incubar durante exatamente 2 minutos. Juntar em cada poço 25  $\mu$ l de substrato cromogênico do Fator IIa.

Proceder à leitura da velocidade de variação da absorbância em 405 nm (V.2.14) e continuar durante 3 minutos de modo obter a velocidade média de variação da absorbância. Se não for possível uma leitura contínua, determinar a absorbância em 405 nm em intervalos consecutivos apropriados, por exemplo, de 40 em 40 s. Construir o gráfico linear dos valores de absorção em função do tempo e calcular a velocidade média de variação da absorbância. A partir dos valores individuais encontrados para cada diluição do padrão e da amostra, calcular a atividade da amostra e verificar a validade do doseamento pelos métodos estatísticos habituais (VI.).

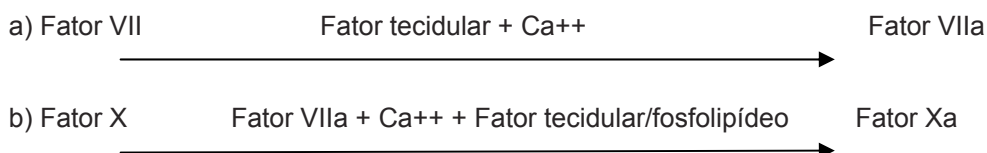
## DOSEAMENTO DO FATOR VII DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA

O doseamento do Fator VII da coagulação é realizado pela determinação da sua atividade biológica como um cofator na ativação do Fator X pelo Fator VIIa / Fator tecidual em presença de íons de cálcio e de fosfolípidos. A atividade de uma preparação do Fator VII é calculada por comparação das quantidades respectivas desta preparação e do padrão internacional ou de uma preparação de referência determinada em unidades internacionais que são necessárias para obter uma velocidade de formação do Fator Xa num meio de reação contendo as diferentes substâncias que intervêm na ativação do Fator X.

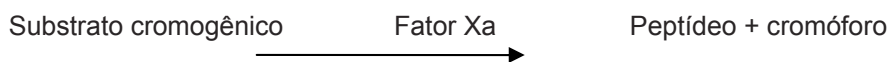
A Unidade Internacional da atividade do Fator VII corresponde à atividade de uma dada quantidade do padrão internacional que é atualmente constituído por um plasma liofilizado. A correspondência entre a unidade internacional e o padrão internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

O método de doseamento cromogénico comporta duas etapas sucessivas: a ativação do Fator X, sob a ação do Fator VIIa, numa mistura reativa contendo o fator tecidual fosfolípido e o íon cálcio e a lise enzimática de um substrato cromogénico pelo Fator Xa que liberta um cromóforo quantificável por espectrofotometria. Em condições apropriadas de doseamento, existe uma relação linear entre a velocidade de formação do Fator Xa e a concentração do Fator VII. O esquema seguinte resume o princípio do doseamento:

### Etapa 1



### Etapa 2



As duas etapas utilizam reagentes disponíveis no mercado originário de diversos fornecedores. Embora a composição destes reagentes possa variar ligeiramente as suas características essenciais são descritas nas especificações que se seguem.

## REAGENTES

A mistura reativa de fatores da coagulação contém especialmente proteínas purificadas de origem humana ou bovina especificamente o Fator X, a tromboplastina e Fator tecidual fosfolípido e um ativador do Fator VII. Estas proteínas são parcialmente purificadas e não contêm impurezas capazes de interferir na ativação do Fator VII ou do Fator X. O Fator X está presente em quantidade tal que a sua concentração final, fora da etapa de ativação, seja de 10-350 nmol/l, de preferência de 14-70 nmol/l. A tromboplastina utilizada pode ser de origem natural (cérebro de boi ou coelho) ou sintética. A tromboplastina utilizada para a determinação do tempo de Quick é diluída de 5 a 50 vezes numa solução tampão de maneira que a concentração final de  $\text{Ca}^{2+}$  seja de 15-25 nmol/l. A etapa final de formação do Fator Xa é conduzida numa solução contendo albumina humana ou bovina a uma concentração em que não ocorram perdas na adsorção e convenientemente tamponada a pH compreendido entre 7,3 e 8,0. O Fator VII é o único Fator que limita a formação do Fator Xa na mistura de incubação final e nenhum dos constituintes reativos da mistura tem o poder de induzir por si só a formação do Fator Xa.

A segunda etapa consiste na quantificação do Fator Xa formado na etapa precedente, no meio de um substrato cromogénico específico do Fator Xa. Este substrato é geralmente um peptídeo curto derivado de 3 a 5 ácidos aminados ligados a um grupamento cromóforo. A cisão deste grupamento e do substrato peptídico promove um deslocamento da atividade cromofórica para um comprimento de onda que permite a sua quantificação por espectrofotometria. O substrato é geralmente dissolvido em água e utilizado numa concentração final de 0,2-2 nmol/l. Pode igualmente compreender os inibidores apropriados impedindo o prosseguir da formação do Fator Xa (adição de iodeto).

## TÉCNICA

Reconstitua o conteúdo de uma ampola da preparação de referência e da amostra juntando uma quantidade de água pretendida e uma vez reconstituídas utilize-as no espaço de uma hora. Juntar às preparações reconstituídas a quantidade de pré-diluíente necessária para obter soluções a 0,5-2,0 U.I. do Fator VII por mililitro.

Preparar as diluições seguintes da preparação de referência e da amostra com uma solução tampão isotônica sem agente de quelação, contendo 1 % de albumina humana ou bovina, e de preferência tamponada para pH 7,3-8,0. Faça de cada uma das duas preparações pelo menos 3 diluições separadas independentes. De preferência em duplicado. A concentração destas diluições em Fator VII é ajustada de modo que a concentração final seja inferior a 0,005 U.I./ml.

Preparar igualmente um testemunho contendo o conjunto dos constituintes da mistura reativa com exceção do Fator VII.

Todas as diluições são preparadas em tubos de plástico e utilizadas durante a 1ª hora.

**Etapa 1.** A cada uma das diluições, obtidas a partir da preparação de referência e da amostra, juntar um volume apropriado do reagente de coagulação pré-aquecido (ou de uma mistura dos seus constituintes separados), misturar e incubar a 37°C em tubos de plástico ou poços de uma microplaca. A concentração dos diferentes constituintes durante a formação do Fator Xa é como a especificada em Reagentes. Deixar desenvolver a reação de ativação do Fator X durante um tempo apropriado; o término da reação acontece de preferência antes que a concentração em Fator Xa tenha atingido o seu nível máximo, a fim de que a curva dose-resposta apresente uma linearidade satisfatória. O tempo de reação é igualmente escolhido de modo que a condição de linearidade da curva de produção do Fator Xa em função do tempo seja satisfatória. É geralmente da ordem de 2 a 5 min, mas são admissíveis certas variações se permitirem melhorar a linearidade da curva dose-resposta.

**Etapa 2.** Parar a reação de ativação por adição de uma mistura reativa contendo o substrato cromogênico. A velocidade de lise do substrato, que é proporcional à concentração do Fator Xa é determinada com o auxílio de um espectrofotômetro pela variação da absorbância num comprimento de onda apropriado. Pode determinar-se a absorbância continuamente, o que permite calcular a velocidade inicial de lise do substrato, quer interrompendo a reação de hidrólise ao fim de um tempo apropriado, baixando o pH com um reagente apropriado tal como o ácido acético a 500 g/l de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> ou uma solução tampão citrada de pH 3 (1 mol/l). Ajustar o tempo de hidrólise de modo que a condição de linearidade de formação do cromóforo em função do tempo seja satisfatória. Este tempo é geralmente da ordem dos 3 a 15 min, mas são toleradas certas variações se permitirem melhorar a linearidade da curva dose-resposta. Verifique a validade da titulação e calcule a atividade da preparação problema pelos procedimentos estatísticos aplicáveis aos ensaios biológicos (VI.).

## DOSEAMENTO DO FATOR IX DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA

Determina-se a atividade da amostra comparando a quantidade da amostra necessária para reduzir o tempo de coagulação de uma mistura de prova que contém as substâncias, além do Fator IX, necessárias para a coagulação do sangue, com a quantidade de uma preparação de referência, avaliada em unidades internacionais, necessária para obter o mesmo efeito.

A Unidade Internacional corresponde à atividade de uma determinada quantidade do padrão internacional constituído por um concentrado liofilizado do Fator IX da coagulação sanguínea. A equivalência em unidades internacionais do padrão internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

Reconstitua respectivamente a amostra e a preparação de referência de acordo com as indicações do rótulo e utilize imediatamente. Quando aplicável, determinar a quantidade de heparina presente (V.5.2.6.) e neutralize-a juntando sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutralizam 1 U.I. de heparina). Dilua a amostra e a preparação de referência com solução tampão de imidazol de pH 7,3 de modo a obter soluções com 0,5 a 2,0 U.I. por mililitro. Com uma mistura de 1 volume de solução de citrato de sódio a 38 g/l e 5 volumes de solução tampão de imidazol de pH 7,3, preparar uma série de diluições compreendendo 1/10, 1/20, 1/40 e 1/80. Estas diluições são preparadas com precisão e são utilizadas imediatamente.

Utilizar, por exemplo, tubos de incubação mantidos em banho Maria a 37°C. Introduza em cada tubo 0,1 ml de substrato de plasma SR e 0,1 ml de cada uma das diluições da preparação de referência e da amostra. Juntar em cada tubo 0,1 ml de uma diluição apropriada de reagente cefalina ou substituto de plaquetas SR e 0,1 ml de uma suspensão de 0,5 g de caulin leve SR em 100 ml de solução de cloreto de

sódio a 0,9 % (p/V) e deixar em repouso durante cerca de 10 min, inclinando os tubos regularmente. Juntar a cada tubo 0,1 ml de solução de cloreto de cálcio a 7,4 g/l. Com o auxílio de um cronômetro, determine o tempo de coagulação, isto é, o intervalo de tempo entre o momento da adição do cloreto de cálcio e a 1ª indicação da formação de fibrina que se observa visualmente ou com aparelhos apropriados. Calcular a atividade utilizando o procedimento estatístico aplicáveis aos ensaios biológicos (V.I.).

Para assegurar que não existe contaminação apreciável do substrato de plasma pelo Fator IX, realizar um ensaio em branco utilizando, em vez da amostra, um volume correspondente de uma mistura de 1 volume de solução de citrato de sódio a 38 g/l e 5 volumes de solução tampão de imidazol de pH 7,3. O ensaio só é válido se o tempo de coagulação determinado no ensaio em branco estiver compreendido entre 100 e 200 s.

### **DOSEAMENTO DO FATOR X DA COAGULAÇÃO SAGUINEA HUMANA**

O doseamento do Fator X da coagulação humana é realizado após ativação específica em Fator Xa, que é calculada por comparação da sua atividade em clivar um substrato cromogênico peptídico específico com a mesma atividade do Padrão Internacional ou de uma preparação de referência aferida em Unidades Internacionais.

A Unidade Internacional do Fator X corresponde à atividade de uma dada quantidade do Padrão Internacional que é constituído por um concentrado liofilizado do Fator X da coagulação sanguínea humana. A correspondência entre a Unidade Internacional e o Padrão Internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

O método de doseamento cromogênico inclui 2 etapas: ativação do Fator X sob ação do veneno de cobra, seguida de clivagem enzimática de um substrato cromogênico pelo Fator Xa que liberta um cromóforo quantificável por espectrofotometria. Em condições de doseamento apropriados, existe uma relação linear entre a atividade do Fator Xa e a clivagem do substrato.

### **REAGENTES**

**Ativador específico do Fator X proveniente do veneno da víbora de Russel (VVR).** Proteína obtida a partir do veneno da víbora de Russel (*Vipera russelli*) que ativa especificamente o Fator X. Reconstituir a preparação seguindo as instruções do fabricante. Uma vez reconstituída, conservar a 4°C e utilizar no espaço de 1 mês.

**Substrato cromogênico para o Fator Xa.** Substrato cromogênico específico do Fator Xa tal como: dihidrocloridrato de N- $\alpha$ -benziloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-4-nitroanilida, hidrocloreto de N-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-glicil-L-arginina-4-nitroanilida, metanosulfonil-D-leucil-glicil-L-arginina-4-nitroanilida, acetato de metoxycarbonil-D-ciclohexilalanil-glicil-L-arginina-4-nitroanilida.

Reconstituir seguindo as instruções do fabricante.

**Tampão de diluição.** Solução contendo 3,7 g/l de tris(hidroximetil)aminometano, 18,0 g/l de cloreto de sódio, 2,1 g/l de imidazol, 0,02 g/l de brometo de hexadimetrina e 1 g/l de albumina bovina ou de albumina humana. Se necessário, ajustar para pH 8,4 com ácido hidroclorídrico.

### **TÉCNICA**

**Solução problema.** Diluir a amostra no tampão de modo a obter uma solução contendo 0,18 U.I. do Fator X por mililitro. Preparar, pelo menos, mais 3 diluições desta solução no tampão de diluição.

**Solução padrão.** Diluir a preparação padrão no tampão de modo a obter uma solução contendo 0,18 U.I. do Fator X por mililitro. Preparar, pelo menos, mais 3 diluições desta solução no tampão de diluição.

Pouco tempo antes do ensaio, colocar todas as soluções num banho-maria a 37°C.

As condições descritas aplicam-se às placas de microtitulação. Se o doseamento é realizado em tubos, ajustar os volumes de modo a manter mistura.

Introduzir 12,5  $\mu$ l das diferentes diluições da amostra e da solução padrão numa série de poços de uma placa de microtitulação mantida a 37°C. Juntar em cada poço 25  $\mu$ l de VVR. Incubar durante exatamente 90 s. Juntar em cada poço 150  $\mu$ l do substrato cromogênico do Fator Xa, diluído 6 vezes no tampão de diluição.



Proceder à leitura da variação de absorvância em 405 nm (V.2.14) e continuar durante 3 min de modo a obter a velocidade média de variação da absorvância. Se não for possível uma leitura contínua, determinar a absorvância em 405 nm com intervalos consecutivos apropriados, por exemplo, 40 s. Construir o gráfico linear dos valores de absorvância em função do tempo e calcular a velocidade média de variação da absorvância. A partir dos valores individuais encontrados para cada diluição do padrão e da amostra, calcular a atividade da amostra e verificar a validade da aferição pelos métodos estatísticos habituais (VI.).