

**VALIDAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO MICROBIOLÓGICO INDUSTRIAL****VALIDATION OF CULTURE MEDIA PRODUCED IN LABORATORY MICROBIOLOGICAL INDUSTRY.**Suyelen Alves¹, Ana Laura de Oliveira Gondim²**Submetido: 18/02/2021****Aprovado: 09/03/2021****RESUMO**

Os meios de cultura devem garantir qualidade e eficiência nas análises, por isso é de suma importância ter um sistema de controle de qualidade em laboratório, que garanta a consistência dos resultados do dia a dia e sua conformidade com os critérios definidos. Este trabalho trata de análises realizadas em campo, onde os testes foram conduzidos em um laboratório de microbiologia industrial, visando aumentar a vida útil dos meios de cultura, realizadas no tempo inicial, 1 mês e 2 meses após a produção dos meios, sendo dividida em análises qualitativas e quantitativas. Os resultados dos testes de promoção de crescimento foram de acordo ao esperado, com colônias crescendo em uma média de 107% de recuperação de microrganismos, dando uma visão das boas práticas realizadas tanto na produção quanto na análise do produto, além de trazer um impacto importante para a empresa, pois promete ganhos significativos em diversas abordagens.

PALAVRAS-CHAVE: Validação. Controle de qualidade. Meios de cultura. Esterilidade. Promoção do Crescimento.

ABSTRACT

The culture media must guarantee quality and efficiency in the analyzes, so it is of great importance to have a quality control system in the laboratory to guarantee the consistency of the day-to-day results and their compliance with the defined criteria. This work is about analyzes carried out in the field, where the tests were done in an industrial microbiology laboratory, aiming to increase the shelf life of the culture media, carried out in initial time, 1 month and 2 months after the production of the media, being divided into qualitative and quantitative analyzes. The results of the growth promotion tests were as expected, with colonies growing with an average of 107% recovery of microorganisms, giving a view of the good practices carried out both in the production and in the analysis of the product, besides bringing an important impact for the company as it promises significant gains in various approaches.

KEYWORDS: Validation. Quality control. Culture media. Sterility. Growth Promotion.

¹ UNICEPLAC - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos: Brasília, DF, BR suyelen.alves@gmail.com

² UNICEPLAC Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos: Brasília, DF, BR analauragondim@hotmail.com - <https://orcid.org/0000-0002-1915-6545>



1 INTRODUÇÃO

Para que as análises microbiológicas tenham resultados seguros, os meios de cultivo utilizados devem garantir qualidade e eficácia na análise. Sendo assim, é de grande importância ter no laboratório um sistema de controle de qualidade para garantir a consistência dos resultados do dia a dia e sua conformidade com os critérios definidos, garantindo assim a segurança do paciente e qualidade do produto.

A farmacopeia afirma que a preparação adequada dos meios, armazenamento e testes de controle de qualidade garantem um fornecimento consistente dos meios, com alta qualidade, pois eles são a base para a maioria dos testes microbiológicos.

Sandle (2014) diz que o prazo de validade dos meios de cultivo precisa ser validado, isso é para avaliar se diferentes níveis de umidade (que podem afetar a atividade hídrica do meio sólido), quimio-oxidação (devido a fatores físicos como calor) e foto-oxidação (da luz solar) afetam o meio.

Pinto et al. (2015) afirmam que para um novo método ser considerado adequado para o uso deve ser validado de forma apropriada, tendo por base definições de validação, para assegurar que qualquer novo método seja adequadamente validado, devendo ser demonstrado sua adequação ao uso, bem como sua reprodutibilidade e que para os resultados serem considerados adequados e reprodutíveis, deve ter base em evidências de que são capazes de recuperar microrganismos na presença do meio.

Fjeld (2011) fala sobre a importância do Teste de Promoção do Crescimento, relata que ele é necessário para garantir que o meio de cultura seja capaz de suportar o crescimento adequado de microrganismos indo de encontro no que diz na farmacopeia brasileira onde afirma que cada lote de meio de cultura deve ser testado quanto a sua capacidade em promover o crescimento de microrganismos, sendo adequado ao uso pela recuperação de bactérias, leveduras e bolores.

É de grande importância que os meios passem por testes de controle de qualidade antes de serem liberados para uso geral, a fim de fornecer uma medida de confiança de que os resultados emitidos pelos laboratórios de microbiologia são precisos.

Esta pesquisa teve por objetivo validar meios de cultura produzidos e utilizados na rotina do laboratório de microbiologia industrial, seguindo, passo a passo, todos os critérios de qualidade e utilizando metodologias de fontes seguras para validação eficaz dos meios de cultura selecionados.

2 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR

VALIDAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO
MICROBIOLÓGICO INDUSTRIAL
Suyelen Alves, Ana Laura de Oliveira Gondim

O trabalho foi realizado em campo no início de fevereiro a abril de 2020, onde os testes foram feitos em laboratório de Microbiologia industrial, no tempo inicial, 1 mês e 2 meses após a produção dos meios de cultura.

2.1 Análises Quantitativa:

Para as análises quantitativas utilizou-se os meios e técnicas de acordo com o descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Meios de cultivo, microrganismos, tempo e temperatura utilizados para os testes quantitativos.

Meio de Cultura	Microrganismo	ATCC	T°C Incubação	Tempo Incubação
TSA (<i>Tryptic Soy Agar</i>)	<i>S. aureus</i>	6538	32,5°±2,5°C	18 a 24 horas
	<i>P. aeruginosa</i>	9027		
	<i>B. spizizenii</i>	6633		
	<i>C. albicans</i>	10231	32,5°±2,5°C	3 a 5 dias
	<i>A. brasiliensis</i>	16404		
SAB (<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>)	<i>C. albicans</i>	10231	22,5°±2,5°C	3 a 5 dias
	<i>A. brasiliensis</i>	16404		

Microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spizizenii*, *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*.

Após preparo dos meios de cultivo, dentro dos critérios estabelecidos para manutenção da esterilidade, foram utilizadas as técnicas *pour plate* e *spread plate* em quadruplicada para cada microrganismo.

Para o método de *pour plate* adicionou-se 1,0 mL de Trifenil tetrazolio cloreto (TTC) 1,0% para cada 100 ml de meio de cultura, tendo por objetivo evidenciar o crescimento das bactérias. O cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) é um corante amplamente utilizado para a contagem de colônias microbianas em meio sólido. É um componente chave do sistema de filme seco hidratável para análise microbiana, é incolor na forma oxidada e vermelho após redução. Microrganismos vivos



reduzem o TTC pela ação de enzimas, produzindo formazan, que permanece nos grânulos da célula e fica vermelho, o que ajuda a identificar as bactérias.

Em seguida foi inoculado 0,1 mL de cada microrganismo em cada placa de Petri vazia estéril, previamente identificada e acrescentou-se 20 mL do meio em teste nas placas, homogeneizando em movimentos em '8' e esperou solidificar. As placas foram incubadas em temperatura e tempo conforme apresentado no Quadro 1.

O controle negativo foi feito utilizando uma placa com meio de cultivo incubada por 72 horas sem nenhuma inoculação, onde não houve crescimento.

Para o controle positivo, repetiu-se todo o procedimento, porém utilizando um lote de meio de cultura previamente aprovado nos testes de fertilidade e esterilidade.

Para a técnica *spread plate* foram inoculados 0,1mL de cada cepa comercial quantificada sobre a superfície do ágar em teste e espalhou-se o inóculo cuidadosamente, utilizando alça de *Drigalski* estéril, para não danificar o ágar. As placas foram incubadas na temperatura e tempo conforme apresentado no Quadro 1.

Fez-se o controle negativo do meio, identificando uma placa do meio em teste como controle negativo com nome do meio, lote e data do teste e incubou-se por um período de 72 horas em temperatura preconizada para o meio de cultura em teste conforme descrito no Quadro 2.

Para o controle positivo, repetiu-se todo o procedimento, porém utilizando um lote de meio de cultura previamente aprovado nos testes de fertilidade e esterilidade.

Calculou-se a porcentagem de recuperação dos microrganismos através de uma regra de três. A contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do controle positivo (lote previamente aprovado) e o percentual de recuperação (teste de fertilidade) deverá estar na faixa de 70% a 130% em todo o tempo do estudo, já o controle negativo (teste de esterilidade) não deverá apresentar crescimento.

2.2 Análises Qualitativas:

Para as análises qualitativas utilizou-se o meio e técnicas de acordo com o descrito no Quadro 2. Para o teste utilizou-se um frasco *schott* estéril previamente identificado, para cada microrganismo, contendo o caldo a ser testado. Em seguida, pipetou-se 0,1mL da cepa comercial quantificada, no frasco *schott*.



Quadro 2 – Meio de cultivo, microrganismo, tempo e temperatura utilizado para o teste qualitativo.

Meio de Cultura	Microrganismo	ATCC	Resultado	T°C	Tempo
			esperado	Incubação	Incubação
Caldo SDB (Sabouraud Dextrose Broth)	<i>C. albicans</i>	10231	Turvação	32,5°±	3 a 5 dias
	<i>A. brasiliensis</i>	16404		2,5°C	

Microrganismos: *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*.

Fez-se um controle negativo do teste incubando-se apenas o caldo em estufa e identificou-se como controle negativo, nome do meio, lote e a data do teste e incubou-se por um período de 72 horas na temperatura preconizada para o meio de cultura em teste conforme quadro 2.

Avaliou-se a capacidade de turvação do meio de cultura de acordo com o inóculo de microrganismo.

3 APRESENTAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

Os controles negativos de tempo inicial, um mês e dois meses tanto para o meio TSA quanto SAB e SDB, tiveram ausência de crescimento. Esse resultado era esperado, uma vez que, quando o meio de cultivo passa por um processo correto de esterilização em autoclave, tanto as formas vegetativas quanto esporuladas são destruídas, isso garante a esterilidade do meio, estando de acordo com que dizem Pinto et al (2015).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, para que qualquer análise microbiológica seja feita, os meios de cultura devem ser esterilizados obrigatoriamente dentro dos parâmetros fornecidos pelo fabricante ou validados pelo usuário. A técnica usual para esterilização é com a utilização da autoclave, onde a esterilização acontece por calor úmido.

Segundo Graziano (2011) o tempo de manutenção da esterilidade está mais relacionada com as condições ambientais de armazenamento e manuseio do que propriamente com o tempo, indicando, assim, que nesse estudo, a forma como os materiais foram armazenadas também foram condizentes.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR

VALIDAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO
MICROBIOLÓGICO INDUSTRIAL
Suyelen Alves, Ana Laura de Oliveira Gondim

Quanto aos controles positivos, todos os meios obtiveram resultados satisfatórios (Quadros 3 e 4). Os meios de cultura TSA E SAB obtiveram recuperação entre 70% a 130%, e o SDB obteve turvação do meio de cultura devido ao inóculo de microrganismo.

A Farmacopeia Brasileira informa que os testes são considerados válidos se houver evidência de crescimento microbiano, visualizados por turvação e/ou por métodos microscópicos, após 3 dias de incubação dos meios inoculados com bactérias e após 5 dias de incubação dos meios inoculados com fungos, estando de acordo com o descrito na Farmacopeia Americana (2013).

Quadro 3: Resultado do teste de promoção de crescimento do teste inicial, um mês e dois meses do meio de cultura TSA pelo método *pour plate*. e *spread plate*.

Resultado do teste de promoção de crescimento %Grupo Teste + Controle Positivo								
Microrganismo	<i>Pour plate</i>			Resultado	<i>Spread Plate</i>			Resultado
	%T inicial	% 1 mês	% 2 meses		%T inicial	% 1 mês	% 2 meses	
<i>S. aureus</i>	116%	110%	100%	Aprovado	112%	110%	103%	Aprovado
<i>P. aeruginosa</i>	118%	89%	116%	Aprovado	113%	116%	107%	Aprovado
<i>B. spizizenii</i>	111%	105%	120%	Aprovado	105%	120%	103%	Aprovado
<i>C. albicans</i>	103%	94%	113%	Aprovado	100%	113%	100%	Aprovado
<i>A. brasiliensis</i>	110%	107%	112%	Aprovado	106%	112%	100%	Aprovado

Microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spizizenii*, *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*.

Quadro 4: Resultado do teste de promoção de crescimento do teste inicial, um mês e dois meses do meio de cultura SAB pelo método *pour plate*.

Resultado do teste de promoção de crescimento %Grupo Teste + Controle Positivo				
Microrganismo	%T Inicial	%1Mes	%2Meses	Resultado Final
<i>C. albicans</i>	104%	105%	100%	Aprovado
<i>A. brasiliensis</i>	108%	100%	119%	Aprovado

Microrganismos: *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*.

A Farmacopeia Brasileira e a Farmacopeia Americana, afirmam também que cada lote de meio de cultura deve ser testado quanto à sua capacidade em promover o crescimento de microrganismos, sendo adequado ao uso pela recuperação de bactérias, leveduras e bolores na presença do produto específico. Tendo como resultado não mais que 100 unidades formadoras de colônia (UFC) de cada cepa microbiana. O que vai de encontro no que diz Washington (2013).

Segundo Field (2011), o Teste de Promoção de Crescimento é uma função muito importante do Controle da Qualidade na Indústria farmacêutica. É indispensável estabelecer as propriedades



nutritivas do meio de cultura microbiológico que será utilizado em um procedimento farmacopeico, como um teste para microrganismos especificados.

Quanto ao teste de turvação (Quadro 5), a Taxa de Recuperação dos microrganismos foram satisfatórias, houve crescimento com turvação visível dos meios testados e esse crescimento foi comparado com o obtido no teste de promoção de crescimento do lote previamente aprovado.

Quadro 5: Resultado do teste de promoção de crescimento do teste Inicial, um mês e dois meses do meio de cultura SDB.

Resultado do Teste de Promoção de Crescimento				
Microrganismo	R. Inicial	R. 1 mês	R. 2 meses	Resultado Final
<i>C. albicans</i>	T	T	T	Aprovado
<i>A. brasiliensis</i>	T	T	T	Aprovado

Microrganismos: *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*.

T: Turvo

NT: Não turvo

O teste de Pesquisa de patógenos foi de encontro ao esperado, observando-se crescimento de colônias com média de 107% de recuperação dos microrganismos, dando uma visão das boas práticas executadas tanto na produção quanto na análise do produto.

Pinto et al, (2015) afirmam que para um novo método ser considerado adequado para o uso deve ser validado de forma apropriada. Tendo por base definições de validação, para assegurar que qualquer novo método seja adequadamente validado, também devem ser demonstradas sua adequação ao uso, bem como sua reprodutibilidade. Como resultado, são considerados adequados e reprodutíveis, com base em evidências de que são capazes de recuperar microrganismos na presença do produto.

Sendo assim, com estes resultados, foi possível validar os meios para o tempo de 2 meses após sua data fabricação.

Dessa forma qualquer um desses meios de cultura (TSA, SAB e SDB) produzidos internamente pelo laboratório microbiológico, podem ser utilizados até 2 meses após a data de fabricação na rotina laboratorial do Controle de Qualidade Microbiológico, dando por completa a validação do procedimento de análise.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR

VALIDAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO
MICROBIOLÓGICO INDUSTRIAL

Suyelen Alves, Ana Laura de Oliveira Gondim

Com o desenvolvimento da proposta de aumento de validade dos meios de cultura, observou-se que a análise efetuada aos testes de promoção de crescimento permitiu fazer um levantamento dos critérios e cuidados necessários no controle de qualidade dos meios e em validações. Foi sobretudo, demonstrada a utilidade destes testes nas análises microbiológicas realizadas na indústria farmacêutica.

As validações executadas tiveram também, um impacto importante para a empresa, pois prometem ganhos significativos quanto às várias abordagens, sendo elas; a sustentabilidade, menor desgastes dos equipamentos e materiais utilizados na produção dos meios, diminuição de perdas por validade, além de possibilitarem a redução de custos e melhorias sem afetar o crescimento e recuperação de microrganismos na presença do meio, mantendo assim a sua qualidade.

Para maior eficiência da nova metodologia sugere-se uma análise de larga escala para avaliar o comportamento de desvios de qualidade, a fim de garantir números satisfatórios para implementação de um novo padrão no setor, podendo trazer uma grande porcentagem de economia no novo método.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 554 p. v. 1

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. 873 p. v. 1

BASU, S.; PAL, A.; DESAI, P K. Quality control of culture media in a microbiology laboratory. **Indian J Med Microbiol**, v. 23, n. 3, p. 159-163, 2005 Disponível em: <http://www.ijmm.org/text.asp?2005/23/3/159/16586>. Acesso em: 22 abr. 2020.

FJELD, K. I. The importance of microbiological quality control in the pharmaceutical industry. **Microbiologics**, 9th June 2011. Disponível em: <https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=4665&c=915960&h=afda0fa8f7644704c799&xt=.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2020.

FARMACOPEIA Americana, USP (2013) **(1117) Microbiological Best Laboratory Practices**. United States Pharmacopoeia 35. Disponível em: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-CE88236A-7EA2-4193-B62B-9638C88BAFEA_1_en-S?source=Search%20Results&highlight=1117 Acesso em: 03 mar. 2020.

FARMACOPEIA Americana, USP (2013) **(62) - Microbiological examination of nonsterile products: Tests for specified microorganisms**. United States Pharmacopoeia. Disponível em: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-A68DE4C6-A898-490B-8198-C9FE1ADF1B60_1_en-US?source=Search%20Results&highlight=62 Acesso em: 03 mar. 2020.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR

VALIDAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO MICROBIOLÓGICO INDUSTRIAL

Suyelen Alves, Ana Laura de Oliveira Gondim

FARMACOPEIA Americana, USP (2013) (71) - **Sterility tests** United States Pharmacopoeia. Disponível em: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-481C30EA-8A49-4A77-9E81-D0CD7C533498_1_en-US?source=Search%20Results&highlight=71 Acesso em: 10 maio 2020.

PINTO, T. A. et al. **Controle Microbiológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos Correlatos e Cosméticos**. 4. ed. Barueri: Manole, 2015. 416 p.

SANDLE, T. Assessment of Culture Media in Pharmaceutical Microbiology. **Pharmaceutical microbiology**, v. 18, jun. 2014. Disponível em: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/163589-Assessment-of-Culture-Media-in-Pharmaceutical-Microbiology/>. Acesso em: 04 abr. 2020.

WASHINGTON, D. C. **Boas práticas da OMS para laboratórios de microbiologia farmacêutica**. Rio de Janeiro: Pan-Americana da saúde, 2013. 37 p.