

CARMEN LUCIA ROCHA

**UTILIZAÇÃO DA ANÁLISE DO PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA  
GENÔMICO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO PARA  
AUXILIAR NA INTERPRETAÇÃO DO ENSAIO DE ESTERILIDADE**

MESTRADO PROFISSIONAL  
PPGVS/NCQS  
FIOCRUZ  
2008

**UTILIZAÇÃO DA ANÁLISE DO PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA  
GENÔMICO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO PARA  
AUXILIAR NA INTERPRETAÇÃO DO ENSAIO DE ESTERILIDADE**

Carmen Lucia Rocha

Mestrado Profissional  
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2008

**UTILIZAÇÃO DA ANÁLISE DO PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO PARA AUXILIAR NA INTERPRETAÇÃO DO ENSAIO DE ESTERILIDADE**

Carmen Lucia Rocha

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional De Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre

Aprovada:

\_\_\_\_\_ (UFRJ)

Prof. Dra. Lúcia Martins Teixeira

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Paola Cardarelli Leite

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)

Orientadora: Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Carmen Lucia

Utilização da Análise do Perfil de Fragmentação do DNA Genômico por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado para auxiliar na Interpretação do Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica/ Carmen Lucia Rocha. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008

XIII, 62 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008. Orientador: Verônica Viana Vieira

1. PFGE 2. Ensaio de esterilidade 3. Imunobiológicos 4. Controle Ambiental. I. Título

Use of Pulsed-Field Gel Eletrophoresis method to assist Sterility assay interpretation

Aos meus pais  
José Belem (in memórium)  
Euarda Esther e Ricardo

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Verônica Viana Vieira por todo conhecimento transmitido, pelo apoio e dedicação para realização de mais esse trabalho.

Aos colegas do SIDB, João, Paulo, Mariana e Caroline pelo incentivo.

Aos colegas da biblioteca do INCQS, Maria Luisa, Vinícius e Alexandre pelo coleguismo e ajuda inestimável.

Ao colega Sergio Alves do Departamento de Química pela grande ajuda e incentivo.

A Priscila por todos os sufocos que passamos juntas.

A querida colega Vanda que fez parte desse caminho e certamente torce por mim mesmo ausente.

Aos meus colegas do mestrado profissional pela vitória que estamos obtendo.

Aos colegas do DM que de alguma forma me ajudaram a concluir mais essa etapa.

Aos meus queridos amigos extra trabalho pela torcida, incentivo, carinho, dedicação e paciência em ouvir meus desabafos.

À Dra. Célia Romão chefe do Depto. de Microbiologia, pelo apoio durante a realização desse trabalho.

Aos profissionais da SECA pela boa vontade e gentileza sempre prontos a ajudar.

## RESUMO

O ensaio de esterilidade é utilizado para avaliar a qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos que requeiram esta característica. A Farmacopéia Brasileira recomenda a realização de até três testes para este ensaio e a caracterização dos contaminantes dos testes e do ambiente onde estes são realizados. Nesse estudo utilizamos a análise do perfil de fragmentação do DNA genômico por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para avaliar 72 amostras bacterianas provenientes de testes de esterilidade de dois imunobiológicos (A e B) e do controle ambiental da área limpa onde os testes são realizados. Vinte e quatro 24 amostras de *Enterobacter cloacae* provenientes de ensaios de esterilidade de 10 lotes do imunobiológico A analisados no período de 1998 a 2007 apresentaram três grupos clonais **a**, **b**, **c**. Dois lotes foram considerados insatisfatórios segundo a interpretação do ensaio de esterilidade recomendada pela Farmacopéia Brasileira. O grupo clonal **a** foi encontrado na maioria dos lotes analisados e considerados satisfatórios e em um dos lotes considerados insatisfatórios pela Farmacopéia Brasileira. A espécie *E. cloacae* não foi isolada do controle ambiental das áreas limpas onde são realizadas as análises. Os bastonetes Gram positivos esporulados (BGPE) analisados foram provenientes de testes de esterilidade do imunobiológico B e de áreas limpas identificados no período de 2005 a 2007. A análise das amostras de BGPE mostrou que apenas três grupos clonais estavam presentes em lotes diferentes. O grupo clonal **3** foi encontrado em dois lotes considerados insatisfatórios no ano de 2006 e o grupo clonal **14** nos lotes 22 e 23 produzidos no ano de 2007 e considerados satisfatórios. Apenas um grupo clonal, o **10** foi encontrado em amostras bacterianas provenientes do imunobiológico B e no controle ambiental. A metodologia de PFGE mostrou ser uma ferramenta valiosa para auxiliar as interpretações do ensaio de esterilidade e avaliar lotes de produtos analisados pelo INCQS/FIOCRUZ permitindo a emissão de laudos mais seguros para respaldar as ações de vigilância sanitária.

## ABSTRACT

The sterility test is applied to evaluate the microbiological quality of pharmaceutical products. The Brazilian Pharmacopoeia recommends up to three tests for this assay and the characterization of contaminants eventually isolated from the tests and the environment where the assay was performed. In this study, we used pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to evaluate 72 bacterial isolates from sterility tests of two immunobiologicals (A and B) and from clean room environments where the tests were carried out. Twenty four *Enterobacter cloacae* isolates from sterility tests of 10 batches of the immunobiological A, carried out on the period from 1998 to 2007, showed three clonal groups **a**, **b** and **c**. Two batches were considered unsatisfactory in according to interpretation of the sterility test recommended by Brazilian Pharmacopoeia. The clonal group **a** was found in the majority of the analyzed batches and one of the batch considered unsatisfactory by Brazilian Pharmacopoeia. This bacterial species was never isolated from clean room environments where tests are performed. Endospore-forming Gram positive rods (BGPE) were isolated from sterility tests of the immunobiological B and from clean room environments identified during 2005 to 2007. The analysis of the BGPE isolates showed only three clonal groups were present in different batches. The clonal group **3** was found in two batches considered unsatisfactory in 2006 and the clonal group **14**, in the batches 22 and 23 produced in 2007 which were considered satisfactory. Only one clonal group, **10**, was found in bacterial samples from immunobiological B and in clean room environmental. The PFGE analysis seems to be a valuable tool to assist the interpretation of sterility tests and to evaluate batches of products analyzed at INCQS/FIOCRUZ, allowing the release of safer results to support the procedures of the sanitary surveillance.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP – Amplified Fragment Length Polimorfism

Anaero – Anaeróbico

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

BAN – Bastonete anaeróbico

BGPE – Bastonete Gram positivo esporulado

BGPNE – Bastonete Gram positivo não esporulado

BGNN – Bastonete Gram negativo não fermentador da glicose

BGNF – Bastonete Gram negativo fermentador da glicose

BGP – Bastonete Gram positivo

BSA – Building Automation Systems

CAS – caseína soja

CDC – Centers for Disease Control and Prevents

CGPN – Coco Gram positivo não fermentador da glicose

CGPF – Coco Gram positivo fermentador da glicose

CHEF DR III – Contour – clamped homogeneous electric field

CT – controle do teste

CF – Controle do fluxo

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DM – Departamento de Microbiologia

EDQM – European Directorate for Quality of Medicines & Health Care

EDTA - Ácido etileno diamino tetra acético

FDA – Food Drug Administration

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

Ft<sup>3</sup> – pé cúbico

HVAC – Heating, Ventilation and Air Condition

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Mg - miligrama

mL – mililitro

µg – micrograma

µm - micrometro

MLST – Multilocus Sequence Typing

## LISTA DE ABREVIATURAS

no – número

ND – Não determinado

NaCl – Cloreto de sódio

NP – Não preconizado

NOTIVISA – Sistema de Notificação em Vigilância Sanitária

OMS – Organização Mundial de Saúde

PFGE – Pulsed Field Gel Eletroforeses / eletroforese em gel submetido a campo pulsado/alternado

PGD – Pharmacopoeial Discussion Group

POP – Procedimento Operacional Padronizado

RAPD – Random Amplification of Polimorphic DNA ( polimorfismo de DNA de amplificação randômica

Ret – reteste

RFLP – Restriction Fragment Length Polimorphism

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SGA – Sistema de Gerenciamento de Amostra

SIDB – Setor de identificação bacteriana

SLST – Single Locus Sequence Typing

SUS – Sistema Único de Saúde

TIO – Fluido tioglicolato

TSA – Tryptic Soy Ágar / Ágar tripticaseína soja

TBE – tampão tris borato EDTA

U – unidade

VISA – Vigilância Sanitária

## Lista de figuras

Figura 1 – Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de <i>Enterobacter cloacae</i> representantes dos grupos clonais a, b, e c isolados do imunobiológico A após digestão com as enzimas de restrição <i>Xba</i> I 1 a 5 e <i>Spe</i> I 5 a 9.....	32
Figura 2. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de <i>E. cloacae</i> representantes do grupo clonal a isolados do imunobiológico A após digestão com a enzima de restrição <i>Xba</i> I.....	33
Figura 3. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de representantes do grupo clonal 3 proveniente do imunobiológico B após digestão com a enzima de restrição <i>Sma</i> I.....	37
Figura 4. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico dos representantes dos grupos clonais 14, 17 e 20 provenientes do imunobiológico B após digestão com enzimas de restrição <i>Not</i> I (1 a 4) e <i>Spe</i> I (5 a 8).....	38
Figura 5. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de representantes dos grupos clonais 8, 9, 10,13, 15 e 16 provenientes do imunobiológico B após digestão com a enzima de restrição <i>Spe</i> I.....	39
Figura 6. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de representantes dos grupos clonais 1, 4, 6, 7 e 21 provenientes do imunobiológico B e 24, 27 e 29 isolados do controle ambiental após digestão com as enzimas de restrição <i>Sma</i> I (1 a 6) e <i>Not</i> I (7 a 9).....	40
Figura 7. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de representantes dos grupos clonais 8, 10, 11 e 12 provenientes do imunobiológico B e 25 isolado do controle ambiental após digestão com enzima de restrição <i>Spe</i> I.....	41

## Lista de tabelas

Tabela 1. Interpretação da Farmacopéia Brasileira e Farmacopéias Harmonizadas (Européia, Japonesa e Americana). .....	9
Tabela 2. Ocorrência dos grupos bacterianos provenientes dos imunobiológicos A e B, dos outros imunobiológicos e o total dos imunobiológicos analisados. ....	25
Tabela 3. Ocorrência dos grupos bacterianos provenientes do controle ambiental ..	26
Tabela 4. Número de amostras dos imunobiológicos A e B que foram analisadas no INCQS/FIOCRUZ no período de 2005 a 2007 e resultados finais. ....	28
Tabela 5. Data do isolamento das amostras de BGPE provenientes do imunobiológico B e do controle ambiental nos anos de 2005 a 2007.....	29
Tabela 6. Dados referentes ao número, lote, data, material e perfil de fragmentação obtido por PFGE das amostras bacterianas provenientes do Imunobiológico A. ....	31
Tabela 7. Dados referentes ao número, data de produção de lote, material, lote, identificação, enzima utilizada para fragmentação do DNA e perfil de fragmentação das amostras bacterianas provenientes do Imunobiológico B.....	35
Tabela 8. Dados referentes ao número, ano de isolamento da amostra, origem, material, identificação da enzima utilizada para fragmentação do DNA e perfil de fragmentação das amostras bacterianas provenientes do controle ambiental.....	42

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Breve histórico da relação entre microrganismos, vigilância sanitária e saúde pública. ....	1
1.2 Identificação bacteriana .....	4
1.3 Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica .....	6
1.4 Controle Ambiental .....	10
1.5 Tipagem Molecular .....	13
1.6 Justificativa .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
3.1 Levantamento de Dados.....	19
3.2 Amostras bacterianas .....	20
3.3 Determinação dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico obtidos pela separação por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	21
3.3.1 Bastonetes Gram Negativos Fermentadores da glicose (BGNF).....	21
3.3.2 Bastonetes Gram Positivos Esporulados (BGPE).....	22
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
4.1. Levantamento de dados .....	24
4.2 Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) .....	30
4.2.1 Análise do Imunobiológico A .....	30
4.2.2 Análise do Imunobiológico B .....	34
4.2.3 Análise das Amostras Provenientes do Controle Ambiental .....	42
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>55</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Breve histórico da relação entre microrganismos, vigilância sanitária e saúde pública.**

A história mostra que muitas questões referentes às doenças, à vigilância sanitária e à saúde pública estiveram relacionadas de alguma forma com os microrganismos. Mesmo antes de serem descobertos, os microrganismos permeavam as ações de saúde pública. Os surtos epidêmicos e endêmicos, que ao longo da história tantas vidas ceifaram, sempre foram motivo de preocupações das autoridades, que tentavam de alguma forma minimizar seus efeitos devastadores, buscando soluções através de algum tipo de ação sanitária, que pudesse fazer frente aos desafios enfrentados pelas sociedades de todas as épocas (ROSEN, 1994; ROZENFELD, 2000; COSTA, 2004).

Os povos antigos já se preocupavam empiricamente com questões de saúde pública e vigilância sanitária. Os cuidados com o suprimento de água e os dejetos datam de muito antes da era cristã. Na Índia, 300 a.C., existiam leis proibindo a adulteração de cereais, medicamentos e perfumes (ROZENFELD, 2000; COSTA, 2004). Na antiguidade clássica os gregos se destacavam como grandes médicos e tentavam entender as relações do homem com a natureza, dando ênfase às questões relacionadas à higiene. Eles atribuíam a falta de saúde à desarmonia entre o homem e o meio ambiente (ROSEN, 1994).

No império romano, há evidências de cidades construídas com ruas largas, pavimentadas, com banheiros e drenagem de esgotos cobertos mostrando a preocupação com a saúde comunitária. Em Roma, existia um sistema público de saúde, hospitais públicos, controle da higiene dos alimentos, inspeção dos mercados e o direito de proibir a venda de gêneros estragados. Os romanos se preocupavam com a relação entre pântanos e doenças e diziam que “nesses lugares encharcados, diminutas criaturas que os olhos não podem ver entram no corpo através da boca e do nariz e causam sérias doenças”. Os relatos sugerem que as doenças a que se

referiam eram a varíola, a difteria, a tuberculose e as infecções estreptocócicas (ROSEN, 1994).

Na Idade Média, aceitava-se que a peste era uma doença “comunicável”, isto é transmissível, mas muitas dúvidas existiam quanto à origem e a natureza das epidemias. Os médicos medievais achavam que o “elemento comunicável” era alguma alteração ou alguma “corrupção” do ar. Eles diziam que a matéria orgânica em decomposição, águas estagnadas e pútridas “corrompiam” o ar e traziam as doenças (ROSEN, 1994). Procurava-se através do tratamento das águas, da drenagem dos esgotos e da quarentena evitar o contágio, que acreditavam que ocorria através do ar atmosférico, dando origem à teoria do miasma.

Doenças como a lepra, peste bubônica, varíola, difteria, sarampo, influenza, ergotismo, tuberculose, e outras também foram identificadas na Idade Média e o medo das pestes estava sempre presente. A idéia do contágio se fortalece e fornece a base para o isolamento de pessoas, notificação de doenças “comunicáveis” e quarentena visando o cuidado com a entrada das doenças nas cidades. Neste período, começa a nascer a prática da vigilância epidemiológica considerada um ramo da vigilância sanitária (ROSEN, 1994).

Em 1546, Giralamos Fracastoro, médico famoso, cientista, poeta italiano, apresentou uma teoria da infecção baseando seus estudos em doenças epidêmicas. Ele afirmou que as doenças eram causadas por diminutos agentes infecciosos, transmissíveis e que se reproduziam por si mesmos e foram denominados de “sementes” ou “seminaria”, que ao se instalarem alteravam os “humores corporais e os princípios vitais do corpo”. Através de seu estudo chegou à natureza particulada do elemento contagioso, sobre a maneira de agir das “sementes” e dizia que eram específicas para cada doença. Giralamos Fracastoro elaborou a primeira teoria científica com alguma consistência sobre o contágio das doenças (ROSEN, 1994).

Na Idade Moderna, nos séculos XVI a XVIII, houve uma grande evolução da ciência com o reconhecimento mais preciso das doenças e a aplicação da ciência na

saúde da comunidade. Apesar do avanço da ciência, as comunidades dos séculos XVI, XVII e XVIII lidavam com as epidemias, assistência médica, saneamento, suprimento de água, quase do mesmo modo que a medieval e persistiu até o século XIX (ROSEN, 1994).

Com o advento do microscópio no século XVI foram observadas formas de vida microscópicas. O primeiro a observar as bactérias e outros organismos microscópicos foi Antony van Leeuwenhoek que em 1676 descreveu as formas hoje conhecidas como cocos, bacilos e espirilos, mas não lhe ocorreu fazer uma conexão entre as doenças e os pequenos animais denominados por ele de “animalcula”. Ele os encontrou em água de chuva, solo e excreções de pessoas saudáveis. Naquela época muitos acreditavam na teoria da geração espontânea ou em germes preexistentes já que esses organismos diminutos eram encontrados em substâncias em decomposição tais como: leite, carne e caldo de carne. O fato desses organismos aparecerem onde antes não eram encontrados levou à suposição da geração dos “animalculas” a partir da matéria inanimada. A teoria da geração espontânea representou um obstáculo à aceitação da teoria dos germes preexistentes. Mesmo após a descoberta dos microrganismos, decorreu um período para se perceber a ligação deles com as doenças, e só a partir de 1850 foram considerados causadores de enfermidades (ROSEN, 1994; TORTORA, FUNKE & CASE, 2000).

Pasteur no final do século XIX destruiu experimentalmente o mito da geração espontânea a partir do cultivo de microrganismos em meio de cultura líquido. Neste período, Robert Koch introduziu em seus estudos, o meio de cultura sólido que possibilitou o isolamento de microrganismos em cultivo puro, que permitiu o desenvolvimento de sistemas de diferenciação e identificação destes organismos (TORTORA, FUNKE & CASE, 2000; KONEMAN et al., 2001).

Durante os três séculos decorridos desde que Antony Von Leeuwenhoek observou pela primeira vez as bactérias e os protozoários com seu microscópio

primitivo acumularam-se inúmeros conhecimentos sobre os animálculos agora conhecidos como microrganismos. Atualmente sabe-se que os microrganismos são encontrados em todos os ambientes e em associação com organismos vivos e que participam de diversos ciclos biológicos e ecológicos que mantêm o equilíbrio em nosso meio ambiente (KONEMAN et al., 2001).

## **1.2 Identificação bacteriana**

Há pouco mais de cem anos tornou-se necessário desenvolver sistemas padronizados para agrupar os microrganismos. Os sistemas de classificação são baseados numa variedade de características que permitem a comparação e identificação de microrganismos. Estes podem ser baseados em características fenotípicas e/ou filogenéticas, entretanto outras propriedades dos microrganismos tais como: a origem, as características ambientais e a patogenicidade podem ser considerados como parte do processo de identificação e classificação (MURRAY et al., 1999; HURST et al., 2002).

Os microrganismos são identificados com finalidades práticas, como por exemplo, a determinação de um tratamento apropriado de uma infecção, determinação de cepas produtoras de substâncias de interesse industrial, controle microbiológico de produtos de consumo humano entre outras. A microbiologia médica, ramo da microbiologia que trata de patógenos humanos, tem dominado o interesse nesta área, entretanto, dentre mais de 2.600 espécies relacionadas nas Listas Aprovadas de Nomes Bacterianos menos de 10% das bactérias são patógenos humanos (EUZÉBY, 2008).

As bactérias não possuem características morfológicas que permitem a sua distinção, por isso os microbiologistas desenvolveram uma variedade de métodos que determinam as reações metabólicas, determinam a composição química de estruturas, além de outras que permitem determinar as características fenotípicas possibilitando desse modo agrupar e identificar os microrganismos (TORTORA, FUNKE & CASE, 2000). O “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (KRIEG &

HOLT, 1984) tem sido uma referência amplamente utilizada para identificação bacteriana.

Os procedimentos convencionais para identificação bacteriana são baseados nas características fenotípicas tais como: reações bioquímicas (fermentação de açúcares, detecção química de subprodutos metabólicos...), características coloniais e morfologia celular determinada pelo método de Gram. Embora eficazes são procedimentos considerados laboriosos e demorados e podem ser influenciados pelas condições de cultivo celular. Contrastando com as provas convencionais que são dependentes de crescimento bacteriano e incluem principalmente meios de cultura seletivos e/ou diferenciais para a determinação do resultado, os testes com substratos cromogênicos de enzimas detectam enzimas pré-formadas nas bactérias (KONEMAN et al., 2001).

A combinação de provas convencionais e provas enzimáticas rápidas com substratos cromogênicos numa única embalagem levou ao desenvolvimento de sistemas de identificação comerciais compactos. Nestas embalagens também denominadas de galeria ou cartão, diferentes conjuntos de substratos são utilizados e proporcionam resultados rápidos que permitem a identificação dos principais grupos bacterianos de importância clínica. Os sistemas compactos surgiram também por necessidade prática. Os cartões requerem pouco espaço para armazenamento, apresentam reações químicas de fácil visualização, possuem vida útil longa e controle de qualidade padronizado fornecido pelos fabricantes (KONEMAN et al., 2001). Muitos estudos realizados em laboratórios clínicos e de pesquisa demonstraram uma correspondência de aproximadamente 95% a 97% entre as identificações realizadas por sistemas compactos e os sistemas convencionais de identificação de vários grupos de microrganismos de origem clínica. Sendo assim, os sistemas compactos encontraram uma ampla aceitação nos laboratórios clínicos como um método confiável para identificação rápida (EIGNER et al., 2005).

Estes sistemas podem ser semi-automatizados ou automatizados tais como: API, VITEK, BIOLOG, etc. O sistema automatizado consiste num aparelho que

possui basicamente um colorímetro e um leitor/incubador que está acoplado a um computador, possibilitando a comparação dos perfis metabólicos obtidos com os perfis estabelecidos no banco de dados do software. O resultado da identificação bacteriana ocorre no máximo em 16 horas (BIO MERIEUX, 2000; 2002; 2003).

As metodologias moleculares têm sido empregadas amplamente na identificação e classificação dos microrganismos por oferecerem maior precisão e reprodutibilidade, quando comparados aos métodos baseados nas características fenotípicas (CLARRIDGE, 2004). Dentre estas metodologias, a análise da seqüência do gene 16S rRNA tem contribuído para a identificação bacteriana, uma vez que este gene é conservado, universal para bactérias e uma grande quantidade de seqüências deste está disponível em banco de dados permitindo assim a comparação das seqüências de cepas desconhecidas (WOESE, 1987; CLARRIDGE, 2004). A dificuldade na identificação de vários gêneros bacterianos por metodologias fenotípicas tem sido relatada em vários estudos que mostram a necessidade de metodologias moleculares para conclusão da identificação (BOSSHARD et. al. 2003; BLACKWOOD et al.; 2004; PATEL et. al., 2004; PETTI, POLAGE & SCHRECKENBERGER, 2005).

### **1.3 Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica**

O ensaio de esterilidade é um teste de segurança biológico que se aplica a insumos farmacêuticos, medicamentos e correlatos que requerem a condição de esterilidade, isto é, a ausência de formas microbianas viáveis capazes de reprodução. Sendo o teste destrutivo, não é possível que todas as frações de um lote sejam submetidas ao ensaio. No ensaio de esterilidade, o resultado satisfatório indica que não foram encontrados microrganismos na amostra examinada, o resultado pode ser estendido ao restante do lote, uma vez que deve ser realizado numa amostra representativa do produto e estatisticamente calculada para os exames necessários a sua liberação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988).

Este ensaio visa verificar a qualidade do processo esterilizante empregado durante a fabricação de produtos estéreis, bem como manipulações assépticas.

Segundo o sub-item 17.19.2 da RDC no. 210 (BRASIL, 2003), o ensaio de esterilidade é considerado a última de uma série de medidas de controle para garantir a esterilidade do produto, e o resultado do ensaio somente pode ser interpretado em conjunto com os registros relativos as condições ambientais e à fabricação do lote.

A Farmacopéia Brasileira, 4<sup>a</sup>. edição (1988), estabelece alguns critérios para a interpretação do ensaio de esterilidade e considera a possibilidade de até três testes antes de liberar o resultado de uma amostra como satisfatória ou insatisfatória. Quando ocorre crescimento microbiano no primeiro teste, o contaminante pode não corresponder ao produto analisado e só deve ser considerado se for detectado por reteste. O reteste deve ser feito de maneira idêntica ao teste inicial. Se não houver evidência de crescimento no reteste, a amostra é considerada satisfatória para o teste de esterilidade. Se houver crescimento no primeiro reteste é recomendado que seja realizado o isolamento e identificação dos contaminantes microbianos do primeiro reteste e comparado com o do teste de esterilidade original. Se os dois contaminantes forem diferentes, deve ser realizado um segundo reteste.

O segundo reteste deve ser feito com o dobro das unidades da amostra utilizadas no teste inicial. Os volumes de cada unidade devem ser os mesmos indicados para o teste inicial. Se não houver evidência de crescimento microbiano, a amostra é considerada satisfatória e caso haja crescimento de qualquer microrganismo, a amostra é considerada insatisfatória para o ensaio de esterilidade.

As recomendações para a interpretação do ensaio de esterilidade bacteriana e fungica dadas pela Farmacopéia Brasileira, (1988) são as mesmas adotadas pela Farmacopéia Européia 3<sup>a</sup>. edição que indicam a realização de até três testes antes da liberação da amostra como satisfatória ou insatisfatória como descrito acima (PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1991; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 1997). Entretanto, a Farmacopéia Européia, na 3<sup>a</sup>. edição (EUROPEAN

PHARMACOPOEIA, 1999) sofreu uma alteração na interpretação do ensaio de esterilidade e passou a recomendar a realização de apenas um teste de esterilidade.

Uma das funções das Farmacopéias é estabelecer os requisitos de qualidade que os medicamentos devem obrigatoriamente obedecer, incluindo todos os componentes empregados na fabricação destes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, existem mais de 50 Farmacopéias no mundo. Os países que não possuem este Código Oficial pode adotar o elaborado por outro país (ANVISA, 2007). A Farmacopéia Européia foi elaborada inicialmente pelos países da Comunidade Européia com o objetivo de uniformizar os requisitos de qualidade dos medicamentos. Atualmente, a Farmacopéia Européia, criada em 1967 possui 37 países europeus como membros efetivos e mais 22 países incluídos como observadores, entre eles estão países europeus, não europeus e a Organização Mundial da Saúde (OMS) (EDMQ, 2008).

Em 1991, o PGD (Pharmacopoeial Discussion Group) elaborou programas de trabalho para harmonizar o conteúdo das três principais farmacopéias do mundo, as farmacopéias da Europa, do Japão e dos Estados Unidos (EUA) (EDQM, 2008). O documento harmonizado também recomenda apenas a realização de um teste de esterilidade e estabelece em que situações o teste deve ser invalidado e um novo teste deve ser realizado para verificar as condições de esterilidade de um produto. O teste deve ser considerado inválido se preencher uma ou mais das seguintes condições: a) os dados relacionados ao controle ambiental do teste de esterilidade mostrem falha; b) uma revisão dos procedimentos utilizados durante o teste revelaram alguma falha; c) quando qualquer crescimento bacteriano for encontrado nos controles negativos; d) a identificação dos microrganismos isolados no teste for decorrente a falhas do teste e de procedimentos (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 1999; UNITED STATE PHARMACOPOEIA, 1999; JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2000). Todas as farmacopéias estabelecem os cuidados que devem ser tomados durante a realização do ensaio, a necessidade da detecção de falhas de procedimento no que diz respeito a técnica, aos operadores e a realização do monitoramento ambiental.

Tabela 1. Interpretação da Farmacopéia Brasileira e Farmacopéias Harmonizadas (Européia, Japonesa e Americana).

	Teste	1º. Reteste	2º. Reteste	Interpretação
Farmacopéia Brasileira	-	x	x	Satisfatório
	+	-	x	Satisfatório
	+	+	x	Insatisfatório <sup>a</sup>
	+	+	+	Insatisfatório <sup>b</sup>
Farmacopéias Harmonizadas	-	NP	NP	Satisfatório
	+	NP	NP	Insatisfatório

+ crescimento bacteriano; - ausência de crescimento bacteriano; x não realizado; NP não preconizado

<sup>a</sup> insatisfatório se espécies iguais nos dois testes; <sup>b</sup> insatisfatório se espécies diferentes no teste e retestes.

O ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica apresenta algumas limitações que têm sido discutidas em alguns estudos. As limitações são referentes ao tamanho da amostragem, escolha do meio de cultura, tempo e temperatura de incubação dos testes e identificação e caracterização dos microrganismos contaminantes dos testes (PINTO, 2003; MOLDENHAUER & SUTTON, 2004; SUTTON & CUNDELL, 2004).

Com relação à identificação e caracterização dos microrganismos contaminantes dos testes de esterilidade, alguns estudos (SUTTON & CUNDELL, 2004; CUNDELL, 2006) mostram a necessidade de metodologias moleculares para a identificação de alguns grupos bacterianos provenientes do controle ambiental e de produtos farmacêuticos. A Farmacopéia Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2005) e a Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2007) mencionam que as técnicas bioquímicas convencionais são geralmente satisfatórias para identificação de microrganismos recuperados pelo teste de esterilidade, mas indicam testes moleculares para fornecer evidência inequívoca que dois isolados são da mesma fonte. Cundell (2006) realizou uma revisão sobre estratégias de identificação e caracterização microbiana em produtos farmacêuticos e em programas de monitoramento microbiano. Ele considera necessária a utilização de metodologias moleculares para análise mais efetiva das

investigações sobre os contaminantes de produtos e ambientes farmacêuticos, com objetivo de identificar a origem e determinar ações preventivas na indústria.

#### **1.4 Controle Ambiental**

Para que o ensaio de esterilidade seja válido, a qualidade do ambiente de execução do teste é importante, devendo a microbiota ser bem controlada e conhecida, a fim de evitar resultados falso-positivos. Segundo os sub-itens 17.1.5 e 18.2 da RDC no. 210 (BRASIL, 2003), os ensaios de esterilidade devem ser realizados em áreas limpas com controle ambiental, definidas em termos de contaminação por partículas viáveis e não viáveis atendendo aos níveis apropriados de classificação segundo as normas vigentes, que deve ser projetada, construída e utilizada de forma a reduzir a introdução, a geração e a retenção de contaminantes em seu interior.

A natureza termolábil de muitos produtos farmacêuticos tem conduzido a uma grande demanda de áreas controladas (LA DUC et al., 2007). A produção de fármacos e biofármacos estéreis assim como o ensaio de esterilidade devem ser realizados em um equipamento de fluxo unidirecional vertical ISO classe 5 (classe 100) que deve ser mantido em áreas limpas ISO classe 7 (classe 10.000) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; BRASIL, 2003).

Na natureza as fontes potenciais de contaminação são ilimitadas sendo que as principais para uma área limpa são o ar, a água, os operadores e os materiais. O ar é microbiologicamente contaminado e considerado provavelmente como primeira fonte e vetor da contaminação microbiana onde a maioria destas contaminações está associada à partículas não-viáveis, (HALLS, 2004a). Devido a esta condição as áreas limpas requerem grandes volumes de ar condicionado, pressurizado e filtrado por filtros de alta eficiência conhecidos como HEPA (High Efficiency Air Filters) ou filtros ULPA (Ultra Low Particulate Air) que não são considerados filtros esterilizantes, mas são capazes de remover a grande maioria dos microrganismos. Estes filtros apresentam uma eficiência de 99,9997% e 99,9998% para partículas de

0,3 µm e 0,12 µm respectivamente. O movimento do ar filtrado possibilita a remoção da contaminação de partículas da área (WHITE, 1986).

Para manter a qualidade do ar da área limpa é necessário um sistema de tratamento do ar, que é formado por um conjunto de dispositivos e equipamentos qualificados, necessários para manter um ambiente com variáveis sob controle. Este sistema é denominado HVAC (Heating Ventilation Air Conditioning) e controla vários parâmetros de áreas limpas, tais como: filtração do ar insuflado, vazão do ar insuflado, pressão diferencial, trocas de ar, temperatura, umidade, velocidade e direção do fluxo do ar, concentração de partículas, contenção e extração de contaminantes gerados no ambiente entre outros. O controle do ambiente é realizado por um sistema automatizado, o BSA (Building Automation Systems) (WHITNEY, 2005).

Outra fonte importante de contaminação de áreas limpas é o operador. Os microrganismos presentes na pele, cabelos, nariz, boca dos indivíduos podem ser dispersos pela respiração, tosse, espirro, movimentação e contato das mãos. A contaminação proveniente do operador é controlada através da utilização de vestimentas esterilizadas e fabricadas com material apropriado e do treinamento quanto às técnicas assépticas, os princípios básicos da microbiologia, da fisiologia microbiana, treinamento em desinfecção e sanitização (HALLS, 2004a). Além destes requisitos os operadores devem cumprir rigorosamente os procedimentos de limpeza e higiene pessoal, e somente indivíduos saudáveis podem ter acesso a estas áreas (BRASIL, 2003; UNITED STATE PHARMACOPOEIA, 2008).

O monitoramento ambiental é fundamental para avaliar a qualidade de uma área limpa e tem como finalidade determinar a eficácia de todos os sistemas e processos utilizados nessas áreas, tais como: a eficácia do sistema de ar (HVAC), das condições assépticas durante a produção ou o ensaio de esterilidade, dos processos de limpeza e sanitização, determinação da contagem de partículas viáveis e não viáveis entre outros. O programa de monitoramento ambiental possibilita a

identificação de rotas de contaminação permitindo a implementação de correções para evitar contaminações (FDA, 2004; HALLS, 2004b).

Nas indústrias farmacêuticas há uma grande preocupação com a contagem de partículas viáveis e o monitoramento microbiológico é realizado para determinação quantitativa e qualitativa da microbiota da área monitorada. A composição da microbiota, isto é a determinação dos gêneros e/ou espécies de microrganismos de uma área limpa proporciona informações vitais para o programa de monitoramento ambiental, podendo indicar a rota de contaminação na produção ou ensaio de esterilidade (BRASIL, 2003).

O monitoramento microbiológico deve ser realizado durante o período de atividade e após sanitização, contemplando amostras de ar, das superfícies da área limpa (bancadas, equipamentos) e dos operadores (BRASIL, 2003; USP, 2008). O monitoramento de superfícies e dos operadores pode ser realizado pelo método de placas de contato ou por “swabs” (hastes flexíveis com material absorvente na extremidade). O monitoramento microbiológico do ar das áreas limpas pode ser realizado pelo método passivo ou ativo. O método ativo é realizado por sistemas comercialmente disponíveis para quantificar as partículas viáveis que funcionam succionando um volume de ar conhecido e impactando o mesmo sobre um meio de cultura que é posteriormente incubado e depois analisado quanto ao crescimento microbiano (FDA, 2004). O método passivo é uma amostragem feita através da exposição de placas contendo meio de cultura, por tempo determinado. Ambos os métodos possuem limitações relacionadas a recuperação dos microrganismos, acurácia e precisão e podem ser considerados métodos qualitativos que proporcionam informações sobre o estado relativo do controle de uma área verso o conteúdo microbiano absoluto (ANDON, 2006). A Farmacopéia Americana não recomenda o método passivo para avaliar qualitativamente a contaminação microbiana em ambientes críticos e existem estudos que mostram que a precisão da contagem de partículas utilizando o método ativo é superior ao passivo (ANDON, 2006; UNITED STATE PHARMACOPOEIA, 2008). Apesar disto, agências

regulatórias da Europa e o FDA citam a utilização do método passivo como opcional e este é amplamente usado na Europa (FDA, 2004; HALLS, 2004b).

Várias fontes oficiais sugerem frequências mínimas e limites máximos para vários tipos de monitoramento. A escolha dos limites a serem adotados depende dos requisitos regulatórios que o produto deve atender. No Brasil a legislação regulatória vigente é a RDC no. 210 (BRASIL, 2003).

### **1.5 Tipagem Molecular**

Métodos de genotipagem são atualmente reconhecidos como os métodos mais precisos para a tipagem de microrganismos (TENOVER et al., 1995). Esses métodos, por analisarem diretamente o material genético dos microrganismos, apresentam melhor poder discriminatório, isto é, habilidade de diferenciar entre amostras bacterianas não relacionadas epidemiologicamente, do que os métodos fenotípicos (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997; SINGH et al., 2006). Estes métodos podem detectar amostras bacterianas geneticamente relacionadas, indistinguíveis uma das outras por métodos de caracterização genética também denominadas como clones, que presumem-se serem derivados de um precursor comum (TENOVER et al., 1995). Sendo assim, é possível avaliar a disseminação de um determinado isolado. Esses métodos incluem, ribotipagem, AP-PCR (“Arbitrariness Primed PCR”), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorfism”), MLST (“Multilocus Sequence Typing”), SLST (“Single Locus Sequence Typing”), análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) entre outros (SINGH et al., 2006; SOLL, PUJOL & LOCKHART, 2007).

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE foi uma metodologia desenvolvida por Schwartz e colaboradores (1983) a partir de uma variação da eletroforese convencional e permite a análise direta do DNA cromossômico. Essa técnica possibilita a separação efetiva de grandes fragmentos de DNA gerados após digestão do cromossomo bacteriano com enzimas de restrição que clivam o cromossoma menos freqüentemente. Neste tipo de eletroforese são utilizados campos elétricos alternados onde as moléculas de DNA

são forçadas a mudarem continuamente de direção, num ângulo de 120°. A separação é baseada na diferença de tempos de reorientação das moléculas e alcança grande eficiência na separação de fragmentos grandes de DNA (SING et al., 2006). Os fragmentos obtidos originam um número relativamente pequeno de bandas no gel que facilitam a interpretação do mesmo e permitem a comparação dos genomas bacterianos em questão (TENOVER, ARBEIT & GOERING, 1997).

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE tem sido amplamente utilizada em investigações de suspeitas de surtos e epidemias de infecções e é uma das metodologias recomendadas por Cundell (2006) para determinar relacionamento clonal e a origem dos contaminantes bacterianos de testes de esterilidade e do monitoramento ambiental. Apesar desta metodologia ter sido recomendada, não há relatos na literatura sobre a utilização desta nos ensaios de esterilidade ou em orientações de Vigilância Sanitária. Sendo assim, neste estudo será empregada análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE para avaliar alguns tipos de contaminantes oriundos de testes e retestes de produtos submetidos ao ensaio de esterilidade e do controle ambiental com intuito de auxiliar a interpretação deste ensaio.

## **1.6 Justificativa**

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é a unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com atuação direta em Vigilância Sanitária. É referência nacional para as questões analítico-laboratoriais relativas ao controle da qualidade de Alimentos; Medicamentos; Soros e Vacinas, Saneantes domissanitários; Conjuntos, reagentes e insumos diagnósticos; Cosméticos; Artigos e insumos de saúde, Artigos e insumos para diálise; Sangue e Hemoderivados; ambientes; e serviços, no contexto do Sistema Único de Saúde (SUS) constituindo-se num dos alicerces do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Estabelece e executa programas de análise para o controle de qualidade em parceria com os serviços de vigilâncias sanitárias federal, estadual e municipal. Executa ações analítico-laboratoriais previstas na legislação sanitária ou por demanda de órgãos do SUS, em suporte aos programas oficiais de saúde.

O desenvolvimento da pesquisa aplicada buscando novas tecnologias para análise é respaldado em diferentes legislações. A lei 8080 em seu capítulo I que trata dos Objetivos e Atribuições, no artigo 6, inciso X menciona a importância de buscar o desenvolvimento científico e tecnológico e no capítulo IV da mesma lei que trata da Competência e das Atribuições na Seção I das Atribuições Comuns, no art. 15, inciso XIX, a importância de realizar pesquisa e estudos na área da saúde (BRASIL, 1990). Esta questão também é corroborada na Constituição Federal, no artigo 200 inciso I, que cita o controle e fiscalização de procedimentos, produtos e substâncias de interesse para a saúde, e no inciso V, a atuação e desenvolvimento científico e tecnológico (BRASIL,1988). O INCQS fazendo parte da rede de laboratórios de saúde pública, participando das ações como órgão de referência nacional para as questões “normativas” e tecnológicas de controle de qualidade de insumos, produtos e serviços tem que estar à frente tentando sempre dar as respostas nas demandas nacionais sempre que essas se apresentarem investindo nas tecnologias de ponta no que diz respeito a sua área de atuação.

O Setor de Identificação Bacteriana (SIDB) do Departamento de Microbiologia (DM / INCQS/ FIOCRUZ tem entre as atividades a identificação de bactérias contaminantes de diversos produtos, provenientes de diferentes Programas desenvolvidos pelo Instituto, que são submetidos ao Ensaio de Esterilidade Bacteriana e Fúngica e de bactérias contaminantes ambientais oriundas do controle de testes e das áreas limpas onde o ensaio é realizado, e também auxiliar os Serviços de Vigilâncias Sanitárias (VISAs) nas ações cabíveis frente a situações que possam trazer risco ou dano para saúde de pessoas expostas a algum produto com contaminação microbiana em que haja necessidade da identificação de bactérias presentes nesses materiais.

A utilização da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE, para avaliar os contaminantes oriundos de testes e retestes de produtos submetidos ao ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica encaminhados ao Setor de Identificação Bacteriana, terá o intuito de auxiliar a interpretação deste ensaio e

avaliar lotes de produtos analisados pelo INCQS/FIOCRUZ permitindo a liberação de laudos com mais segurança para respaldar as ações da Vigilância Sanitária.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar o relacionamento genético de amostras bacterianas provenientes de testes e retestes de dois imunobiológicos submetidos ao ensaio de esterilidade e do controle ambiental empregando a análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico por PFGE com intuito de respaldar e/ou fornecer subsídios adicionais a interpretação do ensaio de esterilidade e também de avaliar lotes de produtos analisados pelo INCQS/FIOCRUZ.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Realizar um levantamento de dados para determinar a ocorrência dos grupos bacterianos provenientes de testes e retestes dos imunobiológicos analisados no período de 2005 a 2007 no INCQS/FIOCRUZ.
  
- Realizar um levantamento de dados para determinar a ocorrência de bastonetes Gram positivos esporulados (BGPE) provenientes de placas do controle ambiental realizado no período de 2005 a 2007 no INCQS/FIOCRUZ.
  
- Realizar um levantamento de dados para determinar a ocorrência de BGPE provenientes de testes e retestes do imunobiológico B e do controle ambiental do período de 2005 a 2007 correlacionando com a data da realização do teste.
  
- Realizar a análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico por PFGE de amostras de *Enterobacter cloacae* identificadas desde o período de 1998 pertencentes a coleção do SIDB e de BGPE contaminantes de testes e retestes de esterilidade do imunobiológicos A e B respectivamente.
  
- Realizar a análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico por PFGE para amostras de BGPE contaminantes de placas do controle ambiental de áreas limpas onde os testes e retestes são realizados.

- Determinar o relacionamento das amostras bacterianas provenientes de testes e retestes utilizando os perfis eletroforéticos obtidos pela metodologia de PFGE e correlacionar com os resultados dos testes e/ou retestes.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Levantamento de Dados**

Neste estudo foram realizados levantamentos de dados a partir das informações presentes nos cadernos de registro de entrada e saída de materiais e no caderno de análise dos isolados bacterianos do SIDB referentes ao período de 2005 a 2007. De acordo com as normas da garantia da qualidade, seguidas pelo INCQS, todas as análises e dados referentes a estas devem ser devidamente registrados em cadernos. Os dados obtidos foram organizados em tabelas.

Apenas os imunobiológicos do Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde (soros hiperimunes, vacinas e diluentes das vacinas) foram incluídos neste estudo. O levantamento referente a essas análises proporcionou a determinação da ocorrência dos grupos bacterianos de acordo com a origem do material em que foram isolados. No SIDB, bactérias são isoladas e identificadas a partir de tubos contendo meio de cultura com crescimento microbiano provenientes dos ensaios de esterilidade de diferentes produtos farmacêuticos, devido a problemas técnicos, ambientais ou do próprio produto e a partir de placas contaminadas provenientes dos fluxos laminares e áreas limpas referentes ao controle ambiental e ao controle dos testes de esterilidade onde são realizados os ensaios. As bactérias identificadas foram agrupadas de acordo com a morfologia celular, características morfotintoriais (coloração de Gram) e capacidade de fermentar a glicose, como: bastonetes Gram positivos esporulados (BGPE), bastonetes Gram positivos não esporulados (BGPNE), cocos Gram positivos não fermentadores da glicose (CGPN), cocos Gram positivos fermentadores da glicose (CGPF), bastonetes Gram negativos não fermentadores da glicose (BGNN), bastonetes Gram Negativos fermentadores da glicose (BGNF), bastonetes anaeróbicos (BAN).

Outro levantamento realizado foi a ocorrência de BGPE isolados a partir de ensaios de esterilidade do imunobiológico B e do controle ambiental relacionando as

datas de realização deste teste visando determinar possíveis fontes de contaminação ambiental do imunobiológico B.

O Sistema de Gerenciamento de Amostras (SGA), um programa que acessa um banco de dados de registro de amostras analisadas no INCQS/FIOCRUZ também foi utilizado para verificar dados relacionados ao número de amostras analisadas pelo INCQS no período de 2005 a 2007 referentes aos dois imunobiológicos (A e B) avaliados neste estudo.

### **3.2 Amostras bacterianas**

As amostras bacterianas foram isoladas a partir de tubos contendo os meios de cultura provenientes de teste e/ou reteste(s) de produtos submetidos ao ensaio de esterilidade ou a partir de placas relativas ao controle ambiental e ao controle dos testes que apresentaram crescimento microbiano. O controle ambiental foi realizado pelo método de amostragem passiva do ar.

O isolamento e a identificação das amostras bacterianas foram realizados segundo os procedimentos operacionais padronizados (POP) do INCQS (MANUAL DA QUALIDADE, 2005; 2006a; 2006b). A identificação foi realizada utilizando metodologias convencionais e sistemas de identificação semi-automatizado (API bioMérieux) e automatizado (VITEK 32 bioMérieux). As cepas isoladas e identificadas recebiam uma numeração exclusiva no Setor de Identificação Bacteriana (SIDB) e esta foi utilizada neste trabalho.

Foram incluídas neste estudo 72 amostras bacterianas. Deste total, vinte e quatro eram amostras de *Enterobacter cloacae* provenientes de testes e/ou retestes do imunobiológico A do período de 1998 a 2007 e quarenta e oito eram BGPE. Sendo que do total de BGPE, 36 foram provenientes de testes e/ou retestes do imunobiológico B do período de 2005 a 2007 e 12 eram do controle ambiental das áreas limpas, do fluxo e do controle de teste de esterilidade do período de 2005 a outubro de 2007. Estas amostras bacterianas foram identificadas com a numeração do SIDB acrescidas da letra A para as relacionadas ao imunobiológico A, da letra B

para o imunobiológico B, da letra C para os fluxos laminares (área classe 100) e a letra D para a sala limpa (área classe 10.000).

### **3.3 Determinação dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico obtidos pela separação por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)**

#### **3.3.1 Bastonetes Gram Negativos Fermentadores da glicose (BGNF)**

O DNA cromossômico das amostras bacterianas de *Enterobacter cloacae* foi preparado pela técnica de lise “in situ”, em blocos de agarose segundo os procedimentos de Teixeira e colaboradores (1997) e Cipriano e colaboradores (2007). Em resumo, as amostras bacterianas foram cultivadas em placas contendo ágar BHI (brain heart infusion) e incubadas por 18 a 24 horas a 37°C. Em seguida 2 a 3 colônias foram repicadas para caldo BHI e incubadas a 37°C até a obtenção de crescimento bacteriano com turvação correspondente ao padrão 2 da escala de McFarland. Uma alíquota de 2 mL daquele crescimento bacteriano foi centrifugada a 3000 g por 10 minutos (eppendorf modelo 5415 C). As células obtidas após centrifugação foram ressuspensas em 250 µL de salina estéril e posteriormente foi adicionado um volume de 250 µL de agarose (low melting, NuSieve, BMA) a 2% em salina 0,85% estéril a 50° C. A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes, solidificada a 4°C por aproximadamente 15 minutos. Os blocos foram então transferidos para tubos contendo 1,5 mL de solução de lise (NaCl 1M; TRIS-HCl 6mM pH 7,6; EDTA 100mM pH 8,0; BRIJ-58 0,5%; desoxicolato 0,2%; sarcosina 0,5% e lisozima 1mg/mL) e incubados a 37°C por 24 horas. Em seguida, o tampão de lise foi substituído por 1,5 mL de tampão ESP (EDTA 0,5 M pH 8,0; sarcosina 1%) contendo 0,1 mg/ml de proteinase K (Sigma) e os blocos incubados a 50°C por 24 horas. Em seguida, o tampão ESP foi substituído por 4 mL de tampão TE (TRIS-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM pH 8,0) e os blocos foram lavados por dez vezes.

Para obtenção dos fragmentos de DNA, 2 blocos contendo o DNA purificado foram incubados com 15 U da enzima de restrição *Xba*I (Promega) e *Spe*I (15U - Invitrogen) e diluída no tampão específico segundo as instruções do fabricante a 37°C durante 24h. Os blocos foram fundidos a 68-70°C e aplicados no gel de

agarose (NA, Amersham) a 1,1 % preparado em tampão TBE (TRIS 44,5 mM; ácido bórico 44,5 mM; EDTA 1mM pH final 8,3). Um padrão contendo fragmentos de DNA com pesos moleculares conhecidos também foi aplicado em um dos orifícios do gel para a avaliação do tamanho dos fragmentos de DNA. Os fragmentos de DNA foram separados em um sistema de eletroforese de campo pulsado, CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, USA), utilizando os seguintes parâmetros: pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 35 segundos, gradiente de voltagem de 6V/cm, temperatura de 13 °C, tempo de corrida de 25 horas.

Após a eletroforese os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5mg/ml) por 15 minutos, descorados por 30 minutos, observados e fotografados no Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico separados em gel de agarose por eletroforese de campo pulsado foi realizada por inspeção visual. Os perfis obtidos foram comparados com o perfil obtido pela amostra bacteriana A2477, pois é correspondente ao primeiro lote do Imunobiológico A que apresentou *Enterobacter cloacae* no teste de esterilidade. As interpretações foram realizadas de acordo com as recomendações de Tenover e colaboradores (1995).

### **3.3.2 Bastonetes Gram Positivos Esporulados (BGPE)**

A preparação do DNA dos BGPE foi realizada conforme descrito no item anterior com as seguintes modificações. As células bacterianas utilizadas para obtenção da suspensão bacteriana com turvação correspondente ao padrão 2 da escala de McFarland foram provenientes de culturas bacterianas obtidas a partir de placas de TSA (tripticase soy agar) incubadas por 18 a 24 horas a 30°C. Após a centrifugação as células foram resuspensas em 250 µL de tampão PIV (NaCl 1M; TRIS-HCl 10 mM; pH 7,6) estéril e posteriormente foi adicionado um volume de 250 µL de agarose (low melting, NuSieve, BMA) a 2% preparado no mesmo tampão a 50°C. Ao tampão de lise foi adicionada a enzima lisostafina (concentração 1,5 µl/amostra) e para obtenção dos fragmentos de DNA, foram testadas três enzimas de restrição *Sma*I (15U - PROMEGA), *Spe*I (15U - Invitrogen) e *Not*I (10U -

Invirogen) utilizando a temperatura para incubação conforme as instruções do fabricante por 24 horas. A eletroforese de campo pulsado foi realizada utilizando-se os seguintes parâmetros: para a fragmentação com a enzima *NotI* e *SpeI*, pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 25 segundos, gradiente de voltagem de 6V/cm, temperatura de 13 °C, tempo de corrida de 25 horas e com a enzima *SmaI*, pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 30 segundos, gradiente de voltagem de 6V/cm, temperatura de 13 °C, tempo de corrida de 24 horas.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Levantamento de dados**

Os dados referentes às identificações bacterianas permitiram verificar a distribuição da ocorrência dos grupos bacterianos de acordo com a origem (Tabela 2). Os imunobiológicos A e B foram selecionados para um estudo mais aprofundado uma vez que havia grupos bacterianos ocorrendo numa frequência maior. No levantamento realizado foi observado que os bastonetes Gram negativos fermentadores e não fermentadores da glicose raramente ocorreram em testes e retestes de imunobiológicos com exceção do imunobiológico A. Para o imunobiológico B foi observado que os bastonetes Gram positivos esporulados ocorreram em testes e retestes com uma frequência maior principalmente nos anos de 2006 e 2007 (Tabela 2).

Tabela 2. Ocorrência dos grupos bacterianos provenientes dos imunobiológicos A e B, dos outros imunobiológicos e o total dos imunobiológicos analisados.

GRUPOS <sup>a</sup> BACTERIANOS	Outros Imunobiológicos			Imunobiológico A			Imunobiológico B			Total dos Imunobiológicos		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007	2005	2006	2007
BGPE	6	9	9	2(2) <sup>b</sup>	2(2)	2(2)	3(3) <sup>b</sup>	22(14)	11(10)	11	33	22
BGPNE	1	1	0	0	0	0	0	2(2)	5(5)	1	3	5
CGPN	2	1	0	1(1)	0	0	0	2(2)	2(2)	3	3	2
CGPF	1	0	0	0	0	0	2(2)	2(2)	1(1)0	3	2	1
BGNN	0	0	0	0	1(1)	6(5)	0	1(1)	0	0	2	6
BGNF	0	0	0	0	0	2(1)	0	0	0	0	0	2
BAN	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
BGNI	0	1	0	0	0	1(1)	0	0	0	0	1	1
TOTAL	11	12	10	3(3)	3(3)	11(9)	5(5)	29(21)	19(18)	19	44	40

<sup>a</sup> BGPE - bastonetes Gram positivos esporulados, BGPNE - bastonetes Gram positivos não esporulados, CGPN - cocos Gram positivos não fermentadores da glicose, CGPF - cocos Gram positivos fermentadores da glicose, BGNN - bastonetes Gram negativos não fermentadores da glicose, BGNF - bastonetes Gram negativos fermentadores da glicose, BAN – bastonetes anaeróbicos, BGNI - bastonetes Gram negativos cujo teste de fermentação da glicose não foi realizado.

<sup>b</sup> ( ) número de lotes, alguns lotes foram submetidos a retestes.

Tabela 3. Ocorrência dos grupos bacterianos provenientes do controle ambiental

Grupos <sup>a</sup> bacterianos	2005			2006			2007			TOTAL
	Sala	Fluxo (CT) <sup>b</sup>	Fluxo (CA) <sup>c</sup>	Sala	Fluxo (CT)	Fluxo (CA)	Sala	Fluxo (CT)	Fluxo (CA)	
BGPE	0	2	0	5	1	3	1	1	4	17
<b>BGPNE</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>30</b>
<b>CGPN</b>	<b>13</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>54</b>
<b>CGPF</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>22</b>
BGNN	0	2	0	2	0	0	0	0	0	04
BGNF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	22	15	6	23	22	7	10	11	11	127

BGPE - bastonetes Gram positivos esporulados, BGPNE - bastonetes Gram positivos não esporulados, CGPN - cocos Gram positivos não fermentadores da glicose, CGPF - cocos Gram positivos fermentadores da glicose, BGNN - bastonetes Gram negativos não

fermentadores da glicose, BGNF - bastonetes Gram negativos fermentadores da glicose.

<sup>b</sup> CT Controle de teste

<sup>c</sup> CA Controle ambiental

<sup>d</sup> Os grupos bacterianos predominantes estão em negrito.

Com relação aos dados referentes ao controle ambiental das áreas limpas e dos fluxos onde os testes são realizados e do controle de testes (controle realizado no decorrer dos testes de esterilidade) foi observada principalmente, a ocorrência dos bastonetes Gram positivos esporulados e não esporulados, e dos cocos Gram positivos fermentadores e não fermentadores da glicose. Os bastonetes Gram negativos raramente ocorreram neste ambiente (Tabela 3).

O levantamento do número de imunobiológicos A e B analisados pelo INCQS/FIOCRUZ e submetidos ao ensaio de esterilidade bacteriana e fúngica nos anos de 2005 a 2007 está apresentado na tabela 4. Estes dados mostraram que uma pequena porcentagem dos lotes analisados apresentou resultado insatisfatório. No ano 2006 apenas 1,47% e 0,85% dos lotes dos imunobiológicos A e B, respectivamente. Nos anos de 2005 e 2007 todos os lotes dos imunobiológicos A e B tiveram laudos satisfatórios.

Dos lotes do imunobiológico A submetidos ao ensaio de esterilidade, alguns apresentaram contaminação nos seus respectivos testes e retestes. Nos anos estudados, 2005, 2006 e 2007 foram submetidas a reteste, 3 (2,08%), 3 (4,41%) e 9 (10,46%) lotes do imunobiológico A, respectivamente, entretanto apenas um destes lotes, em 2006, apresentou contaminação no reteste e foi considerado insatisfatório de acordo com os critérios de interpretação da Farmacopéia Brasileira (1988). Para o imunobiológico B observamos que o número de lotes que apresentaram contaminação no teste foi maior do que os valores encontrados para o imunobiológico A. O número de amostras que apresentou contaminação no teste sendo realizado o reteste foi de 5 (2,96%), 21 (8,97%) e 18 (7,79%) nos anos de 2005, 2006 e 2007 respectivamente. Apenas dois desses, em 2006, apresentaram contaminação no reteste e foram considerados insatisfatórios pelo teste de esterilidade segundo os critérios de interpretação da Farmacopéia Brasileira (1988). Em 2007, um lote (lote B21) teve o teste e o reteste contaminados, mas a análise não pode ser concluída (Tabela 4).

Tabela 4. Número de amostras dos imunobiológicos A e B que foram analisadas no INCQS/FIOCRUZ no período de 2005 a 2007 e resultados finais.

Resultados	IMUNOBIOLOGICO A			IMUNOBIOLOGICO B		
	2005	2006	2007	2005	2006	2007
No. de amostras						
INSATISFATÓRIA	-	1	-	-	2	-
SATISFATÓRIA	144	67	84	169	232	230
NÃO SE APLICA	-	-	-	-	-	1
CANCELADA	-	-	2	-	-	-
TOTAL	144	68	86	169	234	231

A análise dos dados relacionados aos BGPE provenientes de testes e retestes do imunobiológico B e do controle ambiental mostrou que nos anos de 2005 e 2007, na data da realização dos testes que apresentaram contaminação por estes microrganismos, não houve contaminação de placas do controle ambiental. No ano de 2006 houve contaminação da placa do controle ambiental (sala) e no teste da amostra 3406 no dia 12 de maio. No ano de 2007 houve contaminação de um teste por BGPE sendo que uma respectiva placa contaminou com BGPNE (Tabela 5).

Tabela 5. Data do isolamento das amostras de BGPE provenientes do imunobiológico B e do controle ambiental nos anos de 2005 a 2007.

	2005		2006		2007	
	Amostra	Controle <sup>a</sup> Ambiental	Amostra	Controle Ambiental	Amostra	Controle Ambiental
Janeiro	-	-	-	-	-	19 <sup>b</sup> - 3501
Fevereiro	-	24 - 3301	-	-	23 - 3504	-
Março	-	-	-	-	-	-
Abril	-	-	17 - 3400 e 3399	-	28 - 3551	-
Maio	-	-	04 - 3404	-	19 - 3552	-
			-	05 - 3401		
			11 - 3405	-	10 - 3540 e 3541	15 - BX <sup>c</sup>
			<b>12 - 3406</b>	<b>12 - 3408 A</b>	-	18 - BX
			-	-	-	-
Junho	01 - 3325	-	-	09 - 3411	-	-
Julho	-	-	26 - 3417	-	-	-
			04 - 3420	-	-	-
			11 - 3428	-	-	-
		14 - 3338	-	21 - 3423	-	-
Agosto	-	-	28 - 3434	-	-	-
	15 - 3344	-	-	04 - 3435	-	-
			-	11 - 3439 A, 3439 B e 3441	14 - 3547 e 3568	10 - 3546 -
			30 - 3452	-	-	21 - 3548
			3458	-	-	-
			3462G	-	-	-
			3462P	-	-	-
Setembro	-	-	12 - 3456	-	17 - 3550	-
			3457	-	23 - 3560	-
			3461	-	24 - 3549	-
			28 - 3476	-	-	-
			3477	-	-	-
Outubro	-	-	-	03 - 3479	-	-
			27 - 3467e 3468	-	08 - 3566	-
Novembro	-	-	07 - 3492	-	-	-
			-	-	-	13 - 3541
			30 - 3480	-	-	-
Dezembro	05 - 3370	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Controle do fluxo, de teste e de sala

<sup>b</sup> Algarismo referente ao dia de realização do teste.

<sup>c</sup> BX- Amostra bacteriana não estocada

## **4.2 Análise dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)**

### **4.2.1 Análise do Imunobiológico A**

Um total de 24 amostras bacterianas de *Enterobacter cloacae* provenientes do imunobiológico A foram submetidas a análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico utilizando a enzima de restrição *Xba*I, sendo que nesta análise foram verificados três perfis de fragmentação denominados de grupos clonais a, b e c de acordo com a comparação do perfil da amostra A2477, primeiro lote que apresentou contaminação pertencente a coleção do SIDB. Das 24 amostras bacterianas de *E. cloacae*, 18 apresentaram perfis de fragmentação com até 3 bandas de diferença e foram consideradas como pertencentes ao grupo clonal a, 4 amostras que apresentaram perfis com mais de seis bandas de diferença foram caracterizados como grupo clonal b, e o grupo clonal c compreendeu 2 amostras que apresentaram perfis de fragmentação com 5 bandas de diferença (Tabela 6 e Figuras 1 e 2).

O grupo clonal a mostrou 9 perfis de fragmentação denominados a1, a2, a3, a4, a5, a6, a7, a8 e a9. O perfil eletroforético a1 é o padrão representado pela amostra A2477. O perfil de fragmentação a2 foi composto por 5 amostras, A2799, A2802, A2803, A2806 e A2798 e o perfil de fragmentação a3 por 1 amostra bacteriana, A2800, o perfil de fragmentação a4 por 2 amostras bacterianas, A2794 e A2797. As amostras A2796, A2989, A642 e A643 pertencem ao perfil de fragmentação a5 e a amostra A2801 ao perfil de fragmentação a6. Os perfis de fragmentação a7 e a8 foram compostos pelas amostras A641 e A3014, respectivamente, enquanto o perfil de fragmentação a9 pelas amostras A3526 e A3527 (Tabela 6, Figura 2). O grupo clonal b também apresentou mais de um perfil, b1 (amostra A2544) e b2 (A2551, A2555 e A2804). O grupo clonal c pelas amostras A2795 e A2805 (Tabela 6, Figura 1).

Tabela 6. Dados referentes ao número, lote, data, material e perfil de fragmentação obtido por PFGE das amostras bacterianas provenientes do Imunobiológico A.

Número	Lote	Data de produção do lote (mês/ano)	Material <sup>a</sup>	Perfil de Fragmentação
A2477	A001	09/1998	CAS A (TESTE)	a 1
<b>A2544</b>	<b>A002</b>	<b>03/1999</b>	<b>TIO (TESTE)</b>	<b>b 1</b>
<b>A2551</b>	<b>A002</b>	<b>03/1999</b>	<b>CAS A (TESTE)</b>	<b>b 2</b>
<b>A2555</b>	<b>A002</b>	<b>03/1999</b>	<b>CAS B (1ºRETESTE)</b>	<b>b 2</b>
A2799	A003	09/2000	CAS (TESTE)	a 2
A2800	A003	09/2000	TIO A (TESTE)	a 3
A2804	A003	09/2000	TIO B (TESTE)	b 2
A2802	A004	10/2000	CAS (TESTE)	a 2
A2803	A004	10/2000	TIO (TESTE)	a 2
<b>A2794</b>	<b>A005</b>	<b>11/2000</b>	<b>CAS (TESTE)</b>	<b>a 4</b>
<b>A2795</b>	<b>A005</b>	<b>11/2000</b>	<b>CAS A (1ºRETESTE)</b>	<b>c</b>
<b>A2796</b>	<b>A005</b>	<b>11/2000</b>	<b>CAS B (1ºRETESTE)</b>	<b>a 5</b>
<b>A2797</b>	<b>A005</b>	<b>11/2000</b>	<b>TIO A (1ºRETESTE)</b>	<b>a 4</b>
A2805	A006	11/2000	CAS A (TESTE)	c
A2806	A006	11/2000	CAS B (TESTE)	a 2
A2801	A006	11/2000	TIO B (TESTE)	a 6
A2798	A006	11/2000	TIO A (TESTE)	a 2
A2989	A007	06/2002	CAS 1 (TESTE)	a 5
A641	A008	06/2002	CAS 1 (TESTE)	a 7
A642	A008	06/2002	CAS 2 (TESTE)	a 5
A643	A008	06/2002	TIO 1 (TESTE)	a 5
A3014	A009	09/2002	CAS 2 (TESTE)	a 8
A3526	A010	02/2007	CAS (TESTE)	a 9
A3527	A010	02/2007	TIO (TESTE)	a 9

<sup>a</sup> Meios de cultura que são utilizados para a realização do teste de esterilidade: CAS, caldo caseína; TIO, meio de cultura tioglicolato.

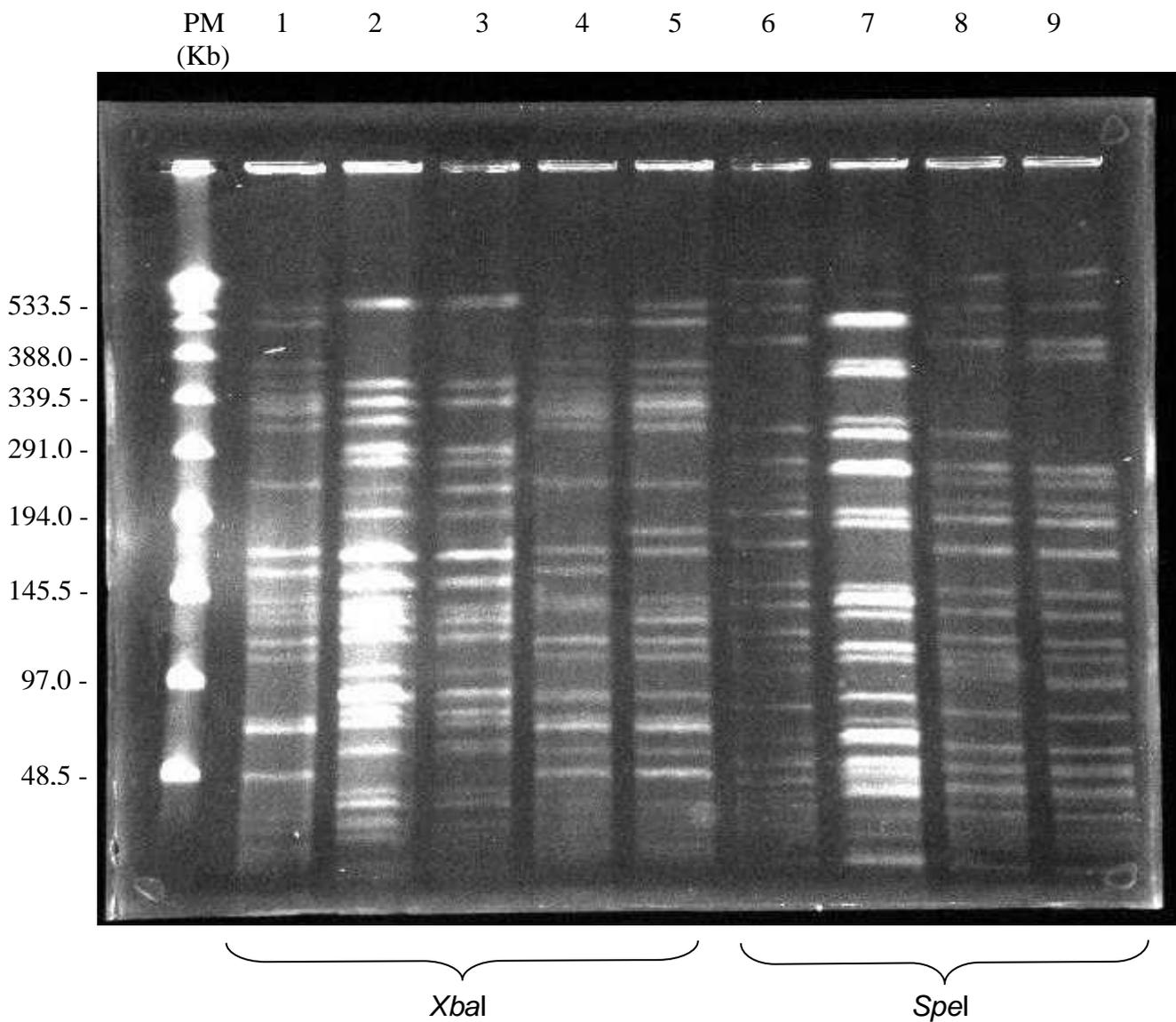


Figura 1 – Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de *Enterobacter cloacae* representantes dos grupos clonais **a**, **b**, e **c** isolados do imunobiológico A após digestão com as enzimas de restrição *Xba*I 1 a 5 e *Spe*I 5 a 9.

PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 - A2477 (a1), 2 – A2544 (b1), 3 – A2804 (b2), 4 – A2800 (a3), 5 – A2795 (c), 6 – A2477 (a1), 7 – A2544 (b1), 8 – A2800 (a3), 9 – A2795 (c).

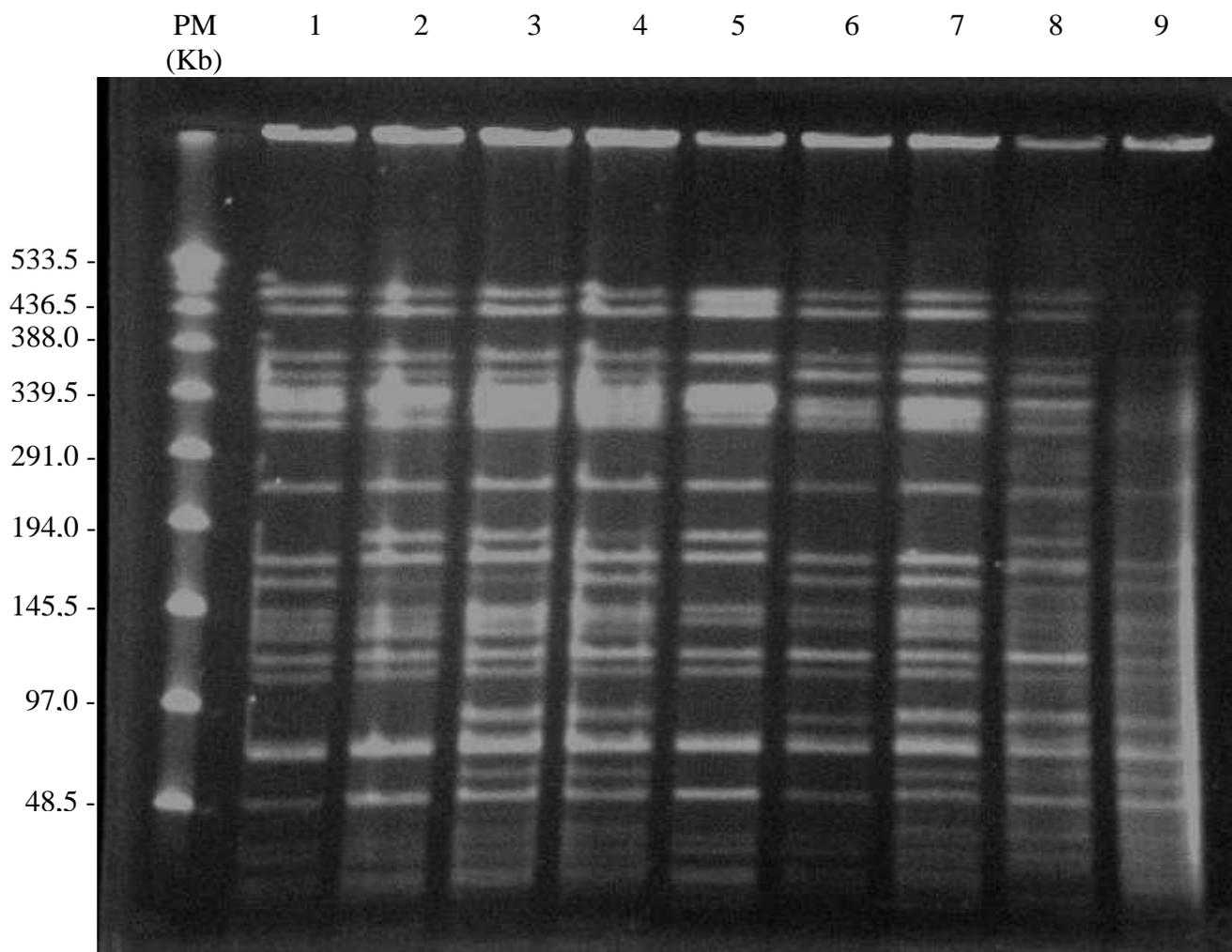


Figura 2. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de *E. cloacae* representantes do grupo clonal **a** isolados do imunobiológico A após digestão com a enzima de restrição *Xba*I.

PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – A2477 (a1), 2 – A2799 (a2), 3 – A2794 (a4), 4 – A2797 (a4), 5 – A2801 (a6), 6 – A641 (a7), 7 – A3014 (a8), 8 – A3526 (a9).

As 24 amostras de *E. cloacae* pertenciam a dez lotes do imunobiológico A, sendo que apenas os lotes A002 e A005 foram considerados insatisfatórios, pois o reteste apresentou como contaminante a mesma espécie bacteriana. Cinco lotes apresentaram mais de um perfil de fragmentação e/ou grupo clonal, entre eles o A002, A003, A005, A006 e A008. Os dados mostram que o perfil de fragmentação a5 detectado no lote A005, que foi considerado insatisfatório, também foi encontrado nos lotes A007 e A008 que foram considerados satisfatórios uma vez que não foi observado crescimento bacteriano no reteste realizado. O perfil de fragmentação b2 encontrado no lote A002 considerado insatisfatório também foi encontrado no lote A003 considerado satisfatório. O grupo clonal **a** foi encontrado amplamente distribuído pelos lotes analisados.

Após a análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico utilizando a enzima de restrição *Xba*I, amostras representantes dos grupos clonais a, b e c foram analisadas utilizando a enzima *Spe*I (Figura 1). A análise utilizando a enzima *Spe*I mostrou que os perfis clonais considerados geneticamente relacionados por apresentarem 4 a 6 bandas de diferença mostraram pertencer a um único grupo clonal. Apenas o grupo clonal b continuou sendo considerado não relacionado geneticamente com os outros grupos.

#### **4.2.2 Análise do Imunobiológico B**

Todos os BGPE analisados neste estudo foram submetidos à análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico utilizando-se a enzima de restrição *Sma*I. As amostras de BGPE que não apresentaram perfil de fragmentação utilizando a enzima *Sma*I foram analisadas utilizando a enzima *Spe*I e novamente as que não apresentaram perfil de fragmentação utilizando uma das duas enzimas citadas foi utilizada a enzima *Not*I. Algumas amostras bacterianas não apresentaram perfil de fragmentação com as três enzimas testadas nas condições de corridas de PFGE utilizadas nesse estudo (Tabela 7 e 8).

Tabela 7. Dados referentes ao número, data de produção de lote, material, lote, identificação, enzima utilizada para fragmentação do DNA e perfil de fragmentação das amostras bacterianas provenientes do Imunobiológico B.

Número	Data de fabricação do lote (mês /ano)	Material <sup>a</sup>	Lote	Identificação <sup>b</sup>	Enzima	Perfil de Fragmentação
B3405	12/05	Cãs	B 07	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	1
B3420	04/06	Cãs	B 11	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	2
B3462pq. <sup>c</sup>	05/06	Cãs	<b>B 14</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 a
B3462grd	05/06	Cas	<b>B 14</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 b
B3458	05/06	Tio	<b>B 14</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 a
B3457	05/06	Tio 1ºReteste	<b>B 14</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 a
B3456	05/06	Cas 1ºReteste	<b>B 14</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 a
B3468	05/06	Tio 2ºReteste	<b>B 14</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 a
B3467	05/06	Cas 2ºReteste	<b>B 14</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 c
B3461	06/06	Cas	<b>B 15</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 a
B3476	06/06	Tio 1ºReteste	<b>B 15</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 d
B3477	06/06	Cas 1ºReteste	<b>B 15</b>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	3 a
B3541	11/06	Cas	B 20	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	4
B3551	02/07	Cas	B 21	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	5
B3550	05/07	Tio	B 24	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	6
B3549	06/07	Cas	B 27	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	7
B3344	05/05	Tio	B 02	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	8
B3417	03/06	Tio	B 09	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	9
B3452	04/06	Tio	B 10	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	10
B3492	07/06	Tio	B 16	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	11
B3480	07/06	Cas	B 17	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	12
B3504	08/06	Tio	B 18	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	13
B3568	04/07	Tio	B 22	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	14
B3547	04/07	Cas	B 23	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	14
B3560	05/07	Cas	B 25	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	15
B3566	05/07	Cas	B 26	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	16
B3325	02/05	Cas	B 01	<i>B. pumilus</i>	<i>Not I</i>	17
B3404	12/05	Tio	B 06	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Not I</i>	18
B3406	12/05	Cas	B 08	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Not I</i>	19
B3428	04/06	Cas	B 12	<i>B. jeotgali</i>	<i>Not I</i>	20
B3540	11/06	Cas	B 19	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Not I</i>	21
B3399	11/05	Cas	B 04	<i>Bacillus</i> sp.	-	ND <sup>d</sup>
B3400	11/05	Cas	B 05	<i>Bacillus</i> sp.	-	ND
B3552	02/07 R	Cas 1ºReteste	B 21	<i>Sporosarcina</i> sp.	-	ND
B3434	04/06	Tio	B 13	<i>Bacillus</i> sp.	-	ND
B3370	09/05	Cas	B 03	BGPE	-	ND

<sup>a</sup> Meios de cultura que são utilizados para a realização do teste de esterilidade: CAS, caldo caseína; TIO, fluido tioglicolato.

<sup>b</sup> Identificação realizada pela análise da seqüência do gene 16S rRNA.

<sup>c</sup> Os lotes em negrito foram considerados insatisfatório

<sup>d</sup> ND- Não determinado

<sup>e</sup> BGPE – bastonete Gram positivo esporulado

As 36 amostras de BGPE provenientes do imunobiológico B apresentaram 21 perfis de fragmentação, como apresentado na tabela 7. Os perfis de fragmentação foram identificados por números de **1** a **21**. A análise dos perfis gerados revelou uma grande diversidade genotípica, como podemos observar nas figuras 3, 4, 5, 6 e 7. Cinco amostras não tiveram seus perfis de fragmentação determinado com as 3 enzimas de restrição utilizadas e nas condições de corrida de PFGE empregadas neste estudo (Tabela 7).

O grupo clonal **3** foi composto de 10 amostras bacterianas que apresentaram quatro perfis de fragmentação distintos por até 3 bandas. O perfil de fragmentação **3a** composto pelas amostras B3456, B3457, B3458, B3462PQ, B3468, B3461 e B3477. A amostra B3462GR apresentou duas bandas diferentes e foi definido como pertencente ao perfil **3b** enquanto a amostra B3467 apresentou duas bandas diferentes do perfil **3a** e **3b** e foi definido como perfil **3c**. A amostra B3476 apresentou duas bandas diferentes dos demais perfis de fragmentação e foi definida como pertencente ao perfil **3d** (Tabela 7, Figura 3). Outros dois grupos clonais contendo duas amostras bacterianas foram observados nesta análise. O grupo clonal **14** foi composto pelas amostras B3547 e B3568 e o grupo clonal **10** pela amostra B3452 e C3479 (Figuras 4 e 5).

O grupo clonal **3** foi encontrado em dois lotes do imunobiológico B no ano de 2006, o B14 e B15 fabricados nos meses de maio e junho. Ambos os lotes foram considerados insatisfatórios, pois o reteste apresentou contaminação. O grupo clonal **14** foi encontrado em dois lotes no ano de 2007, B22 e B23 fabricados no mês de abril, entretanto como o reteste não apresentou contaminação os lotes foram considerados satisfatórios segundo os critérios da Farmacopéia Brasileira (Tabela 7, Figura 4). O grupo clonal **10** foi encontrado no lote B10 e numa amostra do controle ambiental do fluxo laminar (Tabela 7 e 8, figura 5).

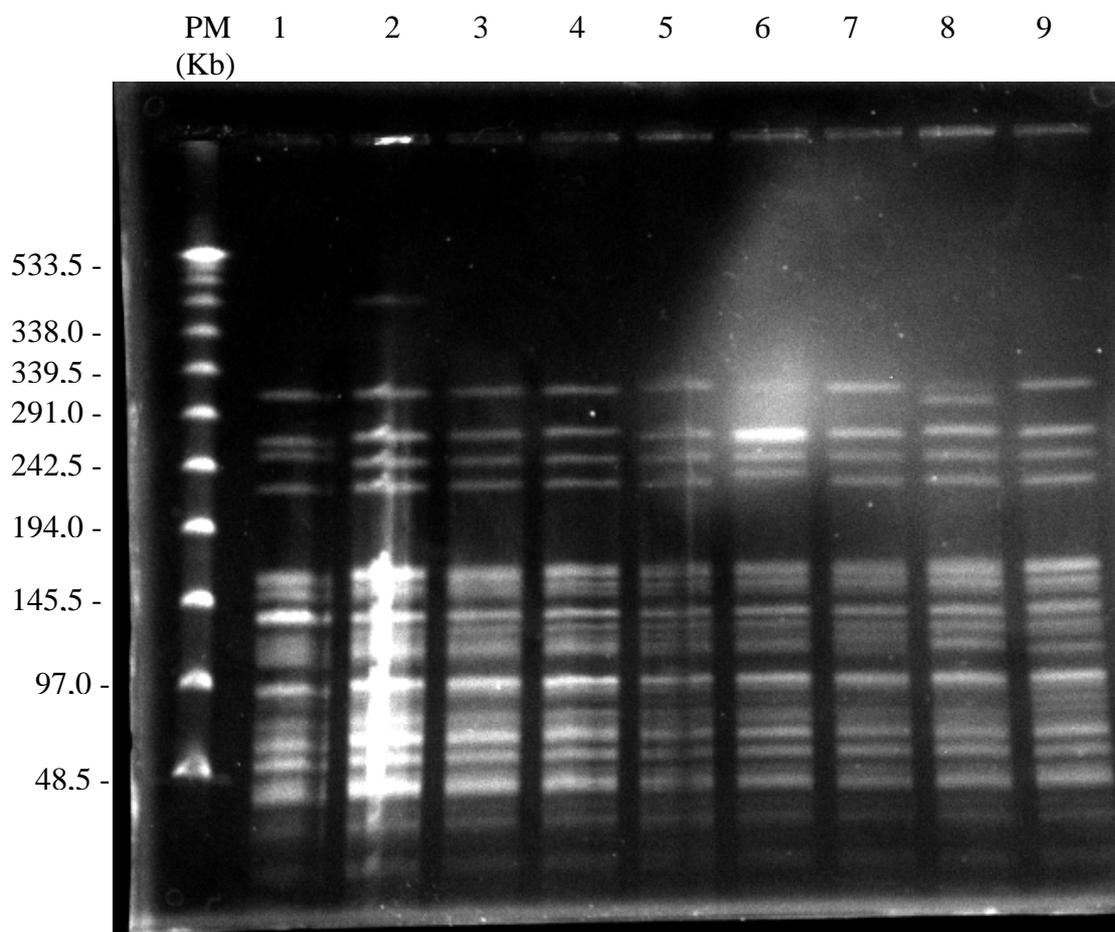


Figura 3. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de representantes do grupo clonal **3** proveniente do imunobiológico B após digestão com a enzima de restrição *Sma*I.

PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – B3462gr (3b); 2 – B3458 (3a); 3 – B3457 (3a); 4 – B3456 (3a); 5 – B3468 (3a); 6 – B3467 (3c); 7 – B3461 (3a); 8 – B3476 (3d); 9 – B3477 (3a).

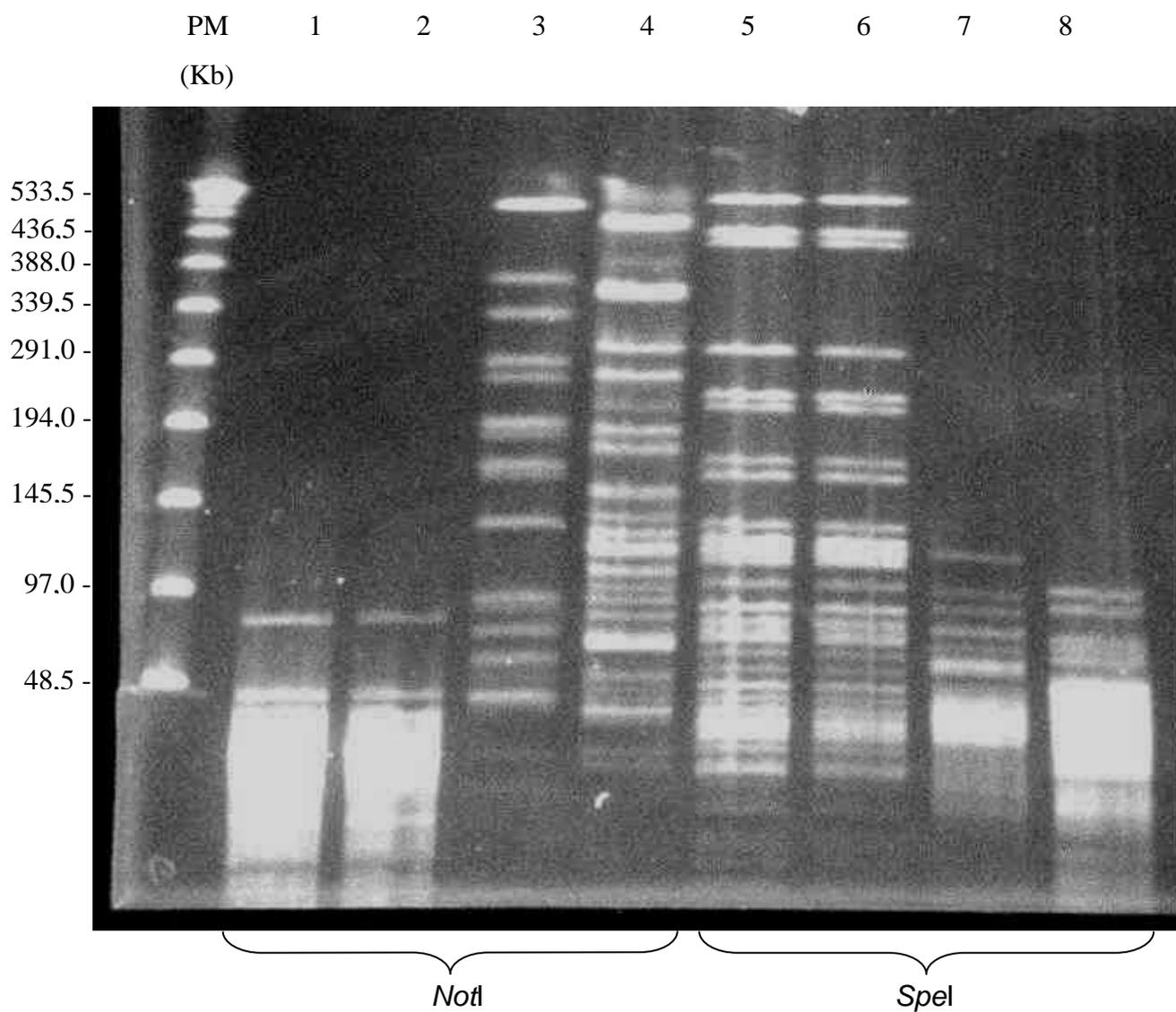


Figura 4. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico dos representantes dos grupos clonais 14, 17 e 20 provenientes do imunobiológico B após digestão com enzimas de restrição *NotI* (1 a 4) e *SpeI* (5 a 8).  
 PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – B3568 (14), 2 – B3547 (14), 3 – B3325 (17), 4 – B3428 (20), 5 – B3568 (14), 6 - B3547 (14), 7 – B3325 (17), 8 – B3428 (20).

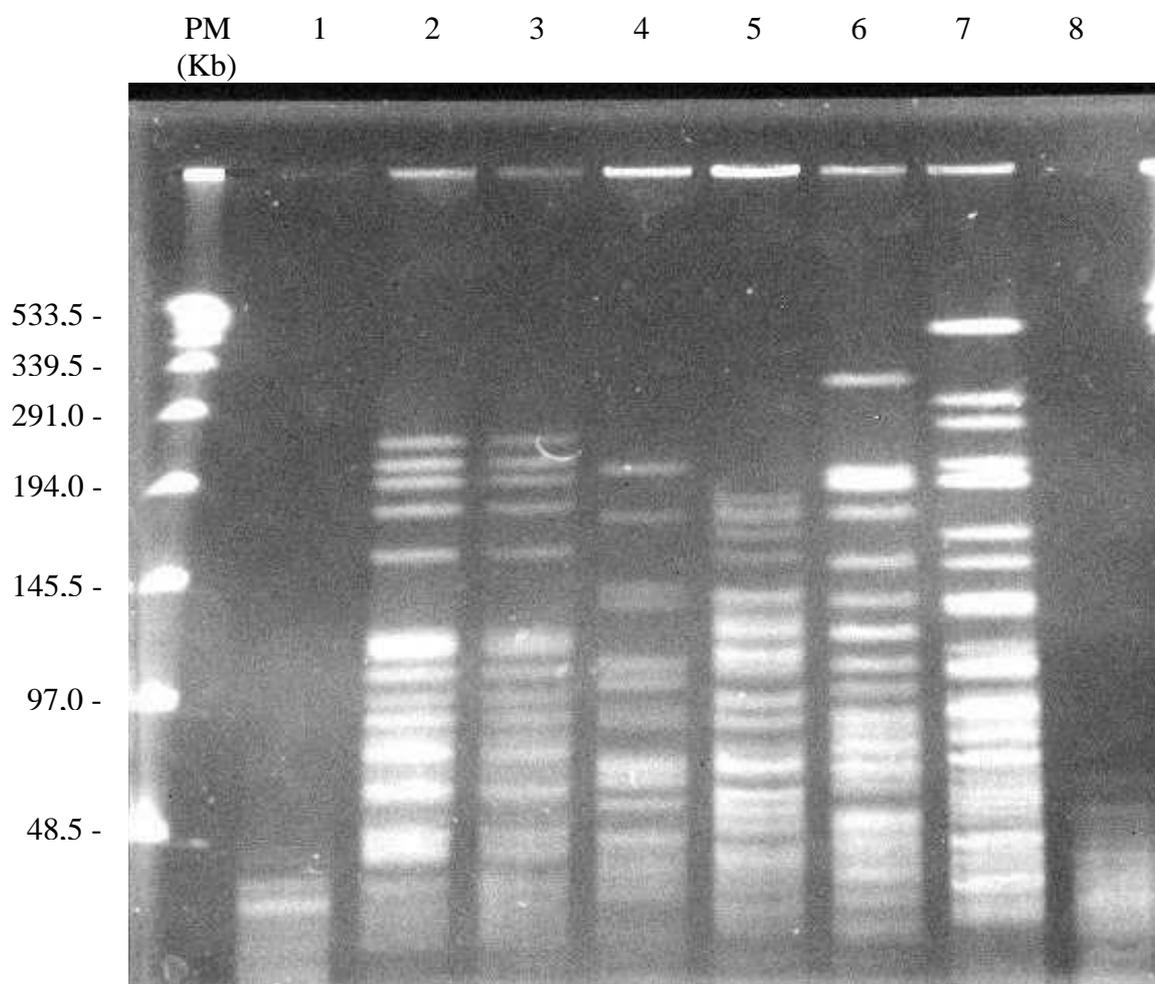


Figura 5. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de representantes dos grupos clonais 8, 9, 10, 13, 15 e 16 provenientes do imunobiológico B após digestão com a enzima de restrição *SpeI*.

PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – B3399 (NT); 2 – B3452 (10); 3 – C3479 (10); 4 – B3417 (9); 5 – B3504 (13); 6 – B3560 (15); 7 – B3566 (16); 8 – B3552 (ND).

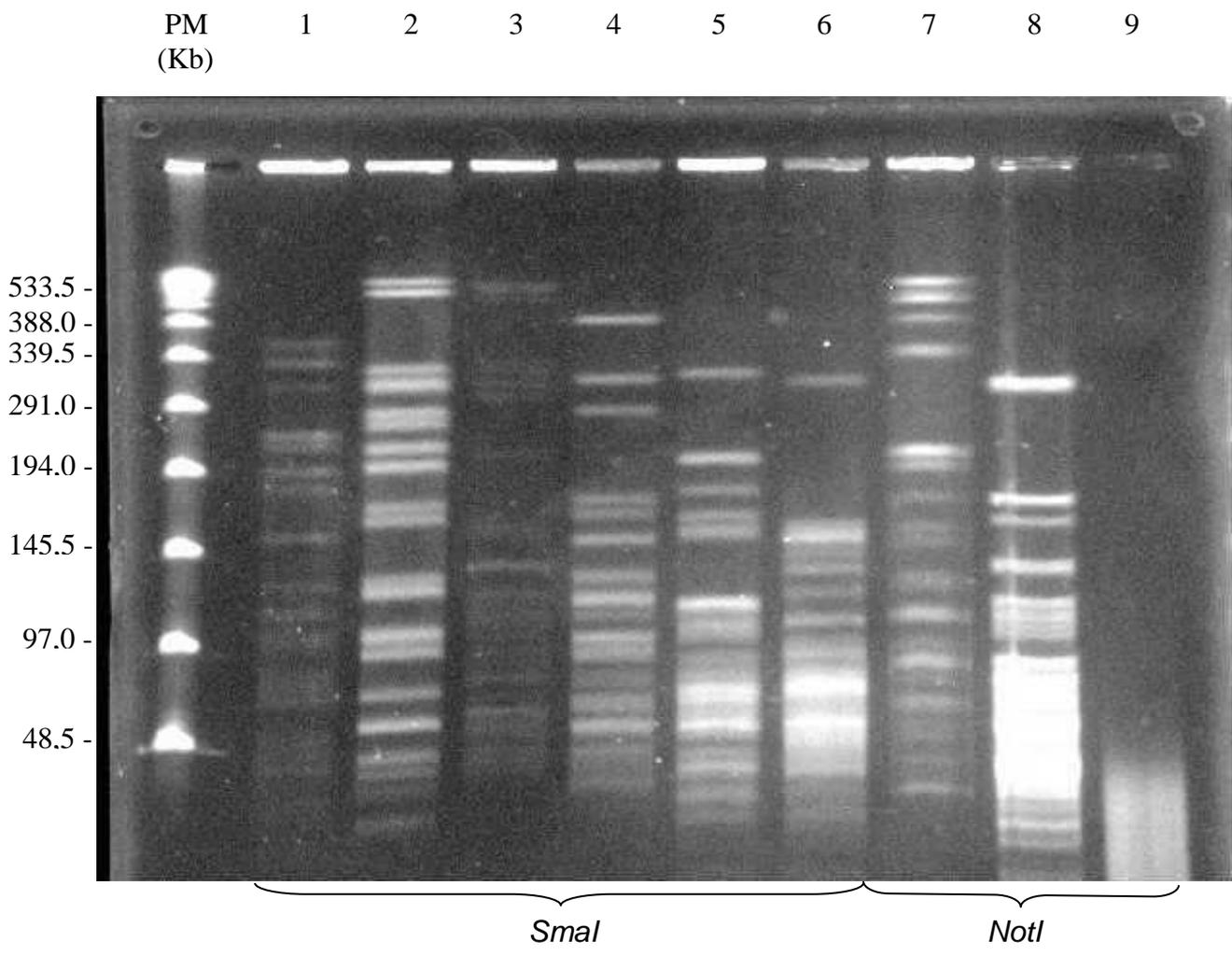


Figura 6. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de representantes dos grupos clonais 1, 4, 6, 7 e 21 provenientes do imunobiológico B e 24, 27 e 29 isolados do controle ambiental após digestão com as enzimas de restrição *SmaI* (1 a 6) e *NotI* (7 a 9).  
 PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – B3541 (4), 2 – B3405 (1), 3 – B3550 (6), 4 – C3441 (27), 5 – D3408A (24), 6 – B3549 (7), 7 – B3540 (21), 8 – C3439B (29), 9 – B3400 (ND).

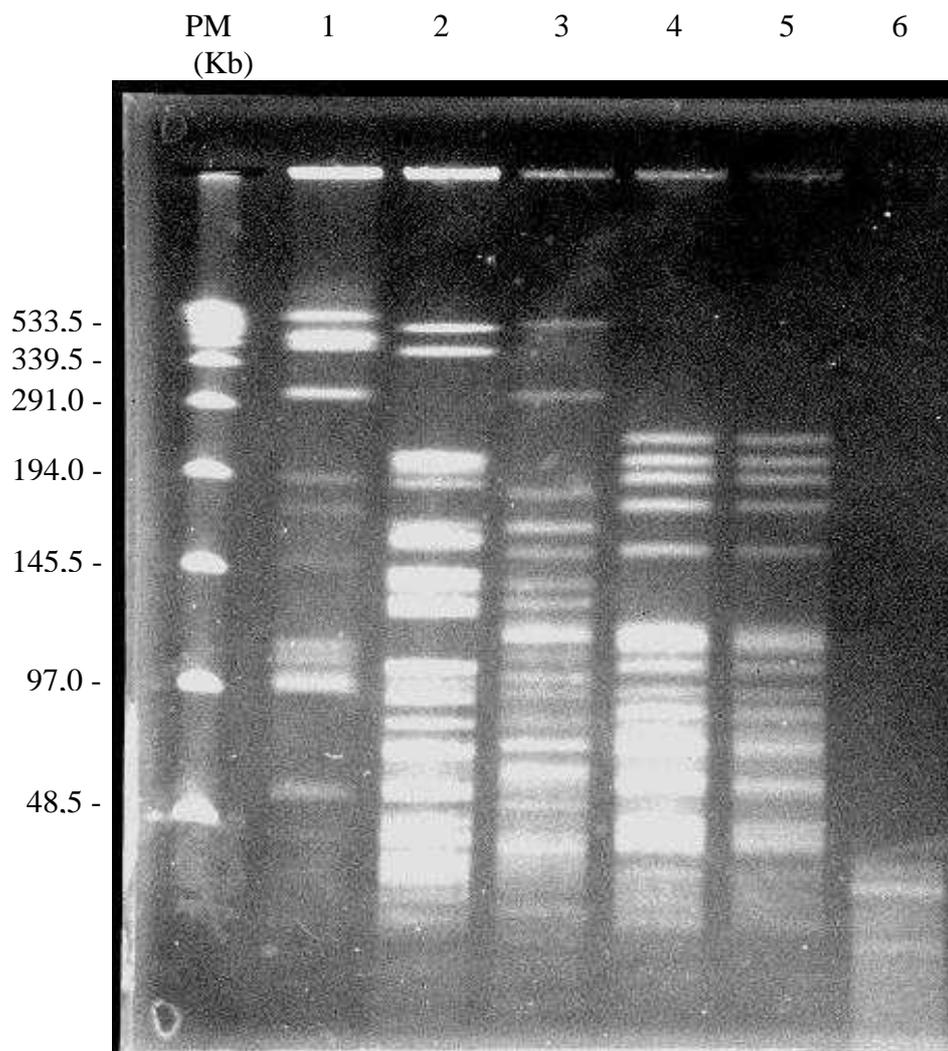


Figura 7. Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de representantes dos grupos clonais 8, 10, 11 e 12 provenientes do imunobiológico B e 25 isolado do controle ambiental após digestão com enzima de restrição *SpeI*.

PM – Peso molecular (kilobase); lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 -B3344 (08); 2 – B3492 (11); 3 – B3480 (12); 4 – B3452 (10); 5 – C3479 (10); 6 – B3399 (ND)

### 4.2.3 Análise das Amostras Provenientes do Controle Ambiental

A tabela 8 mostra os resultados referentes as amostras de BGPE provenientes do controle ambiental, tanto do fluxo laminar como da área limpa do Setor de Esterilidade onde são realizados os testes de esterilidade. Do total de 17 amostras de BGPE isoladas do controle ambiental no período de 2005 a 2007, doze foram analisadas e apresentaram 9 perfis de fragmentação que foram identificados por algarismos arábicos dando seqüência a numeração realizada para as amostras do imunobiológico B. Três amostras não puderam ser tipadas pela metodologia de fragmentação utilizando as três enzimas testadas. A amostra de BGPE C3479 recebeu a identificação 10 uma vez que apresentou o mesmo perfil de fragmentação da amostra B3452 proveniente do imunobiológico B (Figura 4)

Tabela 8. Dados referentes ao número, ano de isolamento da amostra, origem, material, identificação da enzima utilizada para fragmentação do DNA e perfil de fragmentação das amostras bacterianas provenientes do controle ambiental.

Número	Ano	Origem <sup>a</sup>	Material <sup>b</sup>	Identificação <sup>c</sup>	Enzima	Perfil de Fragmentação
C3338	2005	Fluxo-CT	SAB4	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	22
C3401	2006	Fluxo-CA	SAB4	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	23
D3408A	2006	Sala	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	24
D3411	2006	Sala	SAB4	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	25
C3439A	2006	Fluxo-CA	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	26
C3441	2006	Fluxo-CA	TSA	<i>Bacillus koreensis</i>	<i>Sma I</i>	27
C3548	2007	Fluxo-CT	SAB4	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Sma I</i>	28
C3439B	2006	Fluxo-CA	TSA	<i>Paenibacillus</i> sp.	<i>Not I</i>	29
C3479	2006	Fluxo-CT	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Spe I</i>	10
C3301	2005	Fluxo-CT	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	-	ND <sup>d</sup>
D3435	2006	Sala	SAB4	<i>Bacillus</i> sp.	-	ND
C3546	2007	Fluxo-CA	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	-	ND

<sup>a</sup> CT. Controle ambiental de teste; CA. Controle ambiental; <sup>b</sup> Meios de cultura que são utilizados para a realização do teste de esterilidade: SAB4. agar sabouraud 4% de glicose; TSA tryptic soy Agar; <sup>c</sup> Identificação realizada pela análise da seqüência do gene 16S rRNA; <sup>d</sup> ND- Não determinado.

## 5. DISCUSSÃO

A contaminação de produtos farmacêuticos estéreis tem sido pouco relatada na literatura científica. Nos anos 70, alguns casos foram relatados, onde ocorreram mortes por injetáveis contaminados por BGN, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans* e *Citrobacter freundii* (FELTS et al., 1972; CDC, 1973; MAKI et al., 1976). Em 1996, Fernandes e colaboradores descreveram 46 casos de septicemia bacteriana atribuída a injeção de ranitidina contaminada com *Burkholderia pikei* (*Ralstonia pikei*). Jimenez (2007) realizou uma análise dos produtos recolhidos pelo FDA no período de 1998 a 2006 e observou que 78% dos 193 produtos cancelados era devido a problemas na embalagem. Este autor relatou também que em 7% dos casos de cancelamento a causa foi contaminação por fungos e leveduras, em 6% por BGN, em 1% por BGP e em 8% devido a outros microrganismos incluindo espécies de *Micobacterium*.

Apesar dos escassos relatos na literatura científica, as agências reguladoras em todo o mundo, como o FDA (Food and Drug Administration), Agência Européia (EMA), Organização Mundial de Saúde (OMS), CDC (Centers for Disease Control and Prevention), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) entre outros notificam casos de suspeitas de contaminação bacteriana e de cancelamentos de produtos farmacêuticos. No Brasil, a ANVISA possui um sistema de notificações em vigilância sanitária (NOTIVISA) que recebe notificações de eventos adversos e queixas técnicas relacionadas a produtos farmacêuticos. Entretanto os relatórios não discriminam os dados de modo a se obter dados referentes aos produtos farmacêuticos que apresentaram problemas de contaminação bacteriana. No relatório referente ao ano de 2007 foram registradas 65 notificações por efeito adverso de vacinas e imunoglobulinas (ANVISA, 2007). Em dezembro de 2007, alguns lotes das vacinas contra *Haemophilus influenzae* type b (Hib), PedvaxHIB® (monovalent Hib vaccine) e a conjugada contra a hepatite B, COMVAX® (Hib/hepatitis B

vaccine) foram recolhidas devido a contaminação por *Bacillus cereus* (CDC, 2007).

A determinação da condição de esterilidade de um produto é uma etapa essencial na fabricação de fármacos e produtos de saúde. A detecção da contaminação microbiana é baseada na realização do ensaio de esterilidade. Este ensaio é aplicado ao produto final e também em várias etapas da produção de produtos estéreis. Entretanto devido às limitações inerentes deste ensaio, um resultado satisfatório não garante a esterilidade de um produto, é importante a realização da validação dos diferentes processos esterilizantes a que estes são submetidos e a garantia de que esse produto tenha sido produzido sob rígidas condições de qualidade, com todas as precauções que devem ser tomadas durante sua fabricação, em ambientes com monitoramento freqüente e controles adequados (BRASIL, 2003; UNITED STATE PHARMACOPOEIA, 2008).

O ensaio de esterilidade foi oficializado na Inglaterra em 1932 e desde então inúmeras modificações foram feitas (PINTO, 2003). Dentre limitações inerentes ao ensaio de esterilidade, podemos citar os meios de cultura indicados, o tempo e a temperatura de incubação dos meios, amostragem do produto analisado entre outros. Os meios de cultura utilizados nos testes de esterilidade, o tempo e a temperatura de incubação destes estão padronizados nas farmacopéias. A Farmacopéia Européia harmonizada com a Americana e a Japonesa recomendam os meios caldo caseína-soja e tioglicolato, e um período de 14 dias de incubação nas temperaturas de 20 a 25° C e 30 a 35° C. Entretanto, estes meios de cultura não detectam todas as espécies de microrganismos que podem sobreviver ou contaminar um produto. Um estudo realizado com os meios de cultura utilizados nos testes de esterilidade demonstrou que o fluido tioglicolato apresenta toxicidade para algumas cepas de *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp. e sugere a troca do mesmo pelo meio de Clausen, que não apresentou tal característica (BUGNO & PINTO, 2002).

Outro fator limitante do ensaio de esterilidade é a amostragem, que está relacionada ao número de unidades que compõem o lote. De acordo com o tamanho do lote, um número determinado de unidades é utilizado para a realização do teste (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; UNITED STATE PHARMACOPOEIA, 2007). Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988) e a OMS (1973) o número de unidades a serem submetidas ao teste de esterilidade é 20, mas a OMS também recomenda a utilização da fórmula  $0,4 \sqrt{n}$ , para o cálculo das unidades. Nesta fórmula, n é o número de unidades que compõe o lote, e a amostragem está relacionada ao tamanho de unidades que compõem o lote. Sendo assim, dependendo do tamanho do lote a amostragem aumenta consideravelmente. A RDC 73 de 2004 (BRASIL, 2004) aprova o valor de 20 unidades para amostragem de vacinas de uso humano. Segundo o protocolo de produção dos produtores dos imunobiológicos analisados neste estudo o número médio de unidades envasadas por lote desses produtos são respectivamente 40.000 (imunobiológico A) e 9.000 unidades (imunobiológico B), sendo assim, a partir de 2004 a amostragem foi fixada no valor de 20 unidades e houve uma redução significativa no número de unidades testadas para o imunobiológico A, o que implica em tornar o ensaio de esterilidade menos sensível.

A literatura mostra que a probabilidade de detecção de contaminantes microbianos usando uma amostragem de 20 unidades é muito baixa, exceto se houver altos índices de contaminação no produto (BROWN & GILBERT, 1977; SCHROEDER, 2005). Schroeder (2005) afirma que se um lote apresenta o ensaio de esterilidade insatisfatório deve-se concluir que ocorreu alguma falha no processo de produção. Brown e Gilbert (1977) mostraram também que a probabilidade de detecção de contaminantes microbianos no reteste é menor do que no teste. Atualmente, a Farmacopéia Européia harmonizada com as Farmacopéias Americana e Japonesa não recomendam o reteste. No levantamento realizado neste estudo (Tabela 4), verificamos uma percentagem muito baixa de amostras consideradas insatisfatórias pelo ensaio de esterilidade, seguindo os critérios de interpretação da Farmacopéia Brasileira

(1988), que preconiza ainda o reteste, porém se o critério de interpretação do ensaio fosse o indicado pelas Farmacopéias harmonizadas estes valores seriam maiores.

Na interpretação do ensaio de esterilidade pelas Farmacopéias harmonizadas (JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2006; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; UNITED STATE PHARMACOPOEIA, 2008;) há a recomendação da necessidade da identificação inequívoca das espécies do microrganismo(s) isolado(s) no teste para que possam ser comparados com os contaminantes provenientes de material ou de falhas na técnica empregada. A Farmacopéia Européia (2008) acrescenta a interpretação dos resultados, que para invalidar o teste de esterilidade e demonstrar que houve falha, a identificação bioquímica não é suficientemente confiável para fornecer evidência inequívoca que dois isolados são provenientes da mesma fonte e declara que há necessidade de metodologias moleculares para verificar se microrganismos isolados do teste e o proveniente da falha nos materiais e/ou do ambiente são de uma fonte comum. Cundell (2006) também menciona a necessidade da aplicação de metodologias moleculares para auxiliar na investigação da origem dos contaminantes. Este autor recomenda a análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE como uma das metodologias de tipagem molecular que podem ser utilizadas com a finalidade proposta.

Neste estudo dois imunobiológicos (A e B) foram selecionados para realização da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE das amostras bacterianas envolvidas nas análises destes produtos. A escolha foi baseada no levantamento de dados referentes a ocorrência dos grupos bacterianos nos imunobiológicos realizados no período de 1997 a 2004 (dados não mostrados) e de 2005 a 2007 (Tabela 2). O imunobiológico A apresentou os bastonetes Gram negativos como grupo bacteriano mais frequente, isolados de testes e retestes de esterilidade, no período de 1997 a 2004 (dados não mostrados). Uma coleção de bastonetes Gram negativos não fermentadores da glicose, identificados como *Enterobacter cloacae* foi

analisada no presente estudo pela metodologia de PFGE. No período de 2005 a 2007 esta espécie ocorreu apenas duas vezes em 2006. A espécie bacteriana analisada não esteve presente fazendo parte da microbiota das áreas controladas do Setor de esterilidade, onde são realizados os testes de esterilidade nos anos verificados (dados não mostrados), isto é ao longo de dez anos, sendo assim não foi verificada nenhuma relação entre as amostras de *E. cloacae* contaminantes desse produto com os contaminantes ambientais. No período de 1997 a 2007, não foi identificada esta espécie bacteriana isolada de testes de esterilidade do imunobiológico B no ano de 2001 e no período de 2003 a 2006.

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE possibilitou a determinação do relacionamento das amostras de *E. cloacae* provenientes de testes e/ou retestes do imunobiológico A. Esta análise mostrou a presença de três grupos clonais denominados **a**, **b** e **c**. Pela análise realizada com a metodologia de PFGE utilizando duas enzimas diferentes, o grupo clonal **b** mostrou não estar relacionado aos demais grupos encontrados, uma vez que possui perfis de fragmentação bem distintos dos demais. O grupo clonal **b** foi encontrado em dois lotes do imunobiológico A, o A002 (03/1999) considerado insatisfatório e o A003 considerado satisfatório em (09/2000). Os grupos clonais **a** e **c** parecem estar relacionados. Foi observado que utilizando a enzima *SpeI* apenas dois grupos clonais foram visualizados, pois os perfis de fragmentação das amostras pertencentes aos grupos clonais **a** e **c** apresentam diferenças apenas de até três bandas. O grupo clonal **c** também foi encontrado em dois lotes diferentes A005, insatisfatório e A006, satisfatório, mas fabricados no mês de novembro de 2000. O grupo clonal **a** foi encontrado na maioria dos lotes analisados e fabricados em anos diferentes, inclusive no lote A005 considerado insatisfatório. Observamos que os perfis do grupo clonal **a** apresentaram algumas pequenas diferenças ao longo do tempo, entretanto alguns perfis foram encontrados durante um longo período. O Perfil de PFGE **a5** foi encontrado no lote A005 (11/2000) considerado insatisfatório e nos lotes A007 e A008 (06/2002). Em 2007 o lote A010 apresentou o perfil de fragmentação, **a9**

que difere em apenas duas bandas para o perfil **a5**. Apesar do perfil **a9** ter sido detectado 5 anos depois da última amostra desta espécie ter sido identificada parece que poucos eventos genéticos ocorreram nesta amostra.

A interpretação do ensaio de esterilidade foi realizada segundo preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988). Por este critério apenas os lotes A002 e A005 foram considerados insatisfatórios, os demais foram considerados satisfatórios pois não apresentaram contaminação no reteste. A análise nesta coleção de *E. cloacae* realizada com a metodologia de PFGE mostra o estreito relacionamento das amostras isoladas de diferentes lotes, que indica a possibilidade de uma fonte comum de contaminação. A ausência desta espécie bacteriana no controle ambiental das áreas controladas onde são realizados os testes de esterilidade no período desse estudo, e a presença de amostras bacterianas relacionadas geneticamente, nos leva a supor que essa contaminação esteja presente e se mantendo na produção do imunobiológico A. A metodologia de PFGE mostra que lotes considerados satisfatórios deveriam ter sido considerados insatisfatórios. Esta metodologia confirma o que a literatura técnica e científica demonstrou e que outros países vem adotando, que a realização do reteste não deve ser preconizada, pois estatisticamente apenas lotes com um alto nível de contaminação podem apresentar contaminação nos retestes (BROWN & GILBERT, 1977; SCHROEDER, 2005; JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2006; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; UNITED STATE PHARMACOPOEIA, 2008). Nossos resultados podem vir a subsidiar alterações no capítulo referente ao ensaio de esterilidade da Farmacopéia Brasileira.

O imunobiológico B foi selecionado, em detrimento aos outros imunobiológicos, por apresentar maior incidência de BGPE como contaminantes mais freqüentes em testes de esterilidade nos períodos de 1997 a 2004 (dados não mostrados) e de 2005 a 2007 (Tabela 2). Os BGPE foram encontrados numa proporção muito significativa quando comparados aos outros grupos bacterianos que também estiveram presentes como contaminantes

desse produto. No ano de 2005, 60% dos contaminantes foram identificados como BGPE, no ano de 2006 esta proporção chegou a aproximadamente 76% e em 2007 aproximadamente 58% de BGPE. Além deste dado, este grupo bacteriano foi identificado em lotes do imunobiológico B insatisfatórios pelo ensaio de esterilidade.

O grupo bacteriano BGPE encontrado como o grupo bacteriano mais frequente no imunobiológico B é encontrado também fazendo parte da microbiota da área controlada do Setor de Esterilidade (Tabela 3), não sendo no entanto prevalentes. Interessante observar que, o grupo bacteriano mais frequentemente isolado nas áreas controladas são os cocos Gram positivos, principalmente os não fermentadores da glicose que estão relacionados ao ambiente (*Micrococcus* sp., *Kocuria* sp e gêneros relacionados). Os CGP também são encontrados como contaminantes dos imunobiológicos (Tabela 2), porém numa proporção bem menor e no caso de possíveis contaminações acidentais do ensaio de esterilidade este deveria ser o grupo bacteriano mais frequente como contaminante dos imunobiológicos, fato que não foi observado no levantamento realizado. Cabe informar que o ensaio de esterilidade realizado no Setor de Esterilidade do INCQS é acreditado pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), seguindo, portanto todos os requisitos preconizados pelas de normas de garantia da qualidade.

Outro levantamento realizado com amostras de BGPE isoladas do imunobiológico B e do controle ambiental realizado nas áreas controladas do Setor de Esterilidade mostrou que em 2005 e em 2007, quando as amostras do imunobiológico B foram submetidas ao teste de esterilidade, nenhuma amostra de BGPE foi isolada das áreas controladas (fluxo laminar e sala) na mesma data de realização do teste. Apenas em 2006, no dia 12 de maio foi isolada uma amostra de BGPE de teste de um lote de imunobiológico B e outra amostra de controle ambiental (Tabela 4). Estas observações mostram que na realização

dos testes de esterilidade raramente há isolamento de amostra bacteriana que invalide o teste.

As evidências nos levaram a acreditar que os BGPE presentes no imunobiológico B poderiam não apresentar relacionamento genético com os contaminantes presentes na microbiota do ambiente das áreas controladas do Setor de Esterilidade e realmente ser uma contaminação do produto. Sendo assim as amostras de BGPE provenientes do imunobiológico B e do controle ambiental das áreas controladas onde são realizados os testes de esterilidade foram analisadas pela metodologia de PFGE para determinar o relacionamento genético destas amostras bacterianas. A análise das amostras de BGPE pela metodologia de PFGE mostrou que estes microrganismos apresentam uma grande diversidade genética. Algumas amostras não puderam ter seu perfil clonal determinado por esta metodologia empregando-se as condições eletroforéticas utilizadas neste estudo. Das 48 amostras de BGPE provenientes dos testes de esterilidade do imunobiológico B, apenas dois grupos clonais estavam presentes em lotes diferentes. O grupo clonal **14** estava presente nos lotes B22 e B23, produzidos em abril de 2007. Apesar destes lotes apresentarem amostras bacterianas relacionadas geneticamente e isto possivelmente indicar uma fonte comum de contaminação na produção, uma vez que não houve contaminação no controle ambiental quando estes ensaios estavam sendo realizados, estes lotes foram liberados como satisfatórios de acordo com os critérios de interpretação da Farmacopéia Brasileira (1988). Este dado também reforça que na grande maioria das vezes o reteste é desnecessário.

Outro grupo clonal presente em mais de um lote do imunobiológico B foi o **3**. Este grupo clonal foi constituído por 10 isolados provenientes de testes e retestes de 2 lotes distintos, B14 e B15 produzidos em maio e junho de 2006. A identificação fenotípica não foi capaz de discriminar o gênero a que pertenciam estas amostras e pelos critérios de interpretação da Farmacopéia Brasileira é necessário determinar a espécie bacteriana do contaminante. As amostras isoladas a partir dos testes e retestes do lote B14 foram submetidas a análise

pela metodologia de PFGE e foi verificado o relacionamento clonal destas. Este lote foi considerado insatisfatório. As amostras do lote B15 também foram submetidas ao mesmo procedimento e o lote também foi considerado insatisfatório. Neste caso tivemos a oportunidade de empregar a metodologia de PFGE para auxiliar a interpretação do ensaio de esterilidade. Esta metodologia também foi utilizada com a mesma finalidade para analisar as amostras do teste e reteste do lote B21. As amostras pertencentes a este lote não mostraram relacionamento genético, sendo assim, o lote foi considerado satisfatório.

Posteriormente, as amostras provenientes dos lotes B14, B15 e B21 foram submetidas a identificação pela metodologia da análise das sequências do gene 16S rRNA que mostrou que as amostras provenientes dos lotes B14 e B15 pertenciam a uma espécie do gênero *Bacillus* ainda não descrita (dados não mostrados). As amostras provenientes do lote B21 pertenciam ao gênero *Bacillus* (B3551/teste) e ao gênero *Sporosarcina* (B3552/reteste). Estes gêneros não foram diferenciados pelas metodologias fenotípicas indicadas na literatura (dados não mostrados).

O grupo clonal **10** é constituído pela amostra B3452 proveniente de um lote do imunobiológico B detectado em um teste realizado em agosto de 2006 e da amostra F3479 detectada no fluxo laminar, onde são realizados os testes de esterilidade, em outubro do mesmo ano. Das amostras de BGPE do controle ambiental da área de realização dos testes de esterilidade esta foi a única amostra que apresentou relacionamento clonal com amostra proveniente do imunobiológico B, sendo que este clone foi observado primeiramente no teste do imunobiológico B no mês de agosto e depois foi detectado no controle do fluxo laminar em outubro (esse controle foi relativo a um teste em que o produto analisado não apresentou contaminação). Sendo assim, há a possibilidade deste contaminante do imunobiológico B ter contaminado o ambiente do fluxo laminar.

Os perfis de fragmentação encontrados entre as amostras de BGPE do controle ambiental são diferentes dos apresentados nas amostras provenientes do imunobiológico B. A maioria das amostras isoladas do controle ambiental no período de 2005 a 2007 foi incluída neste estudo, entretanto o método de amostragem do ar utilizado foi o método passivo que pode subestimar o número de microrganismos presentes neste ambiente. Vários questionamentos tem sido realizados a respeito desta amostragem, entretanto este método é aceito até por agências reguladoras internacionais, principalmente na Europa (HALLS, 2004).

Várias questões tem sido abordadas em relação a determinação real da microbiota de áreas limpas. Nagarkar e colaboradores (2001) mostraram que as bactérias oligotróficas não são detectáveis com os meios de cultura recomendados nas farmacopéias para a realização do controle ambiental. Estes autores mostraram que, quando meios de cultura adequados para o crescimento de bactérias oligotróficas foram utilizados, outros grupos bacterianos também foram detectados tais como BGN, cocobacilos e BGPNE, enquanto os meios de cultura indicados detectam uma microbiota constituída por espécies de *Micrococcus*, *Staphylococcus* e BGPE. Isso poderia implicar sobre os limites microbiológicos permitidos em ambientes controlados classes 100 e 10.000.

Os dados obtidos neste estudo nos levam a afirmar que a metodologia de PFGE pode ser utilizada não só para auxiliar a interpretação do ensaio de esterilidade, mas também para avaliar lotes de produtos possibilitando o INCQS ampliar suas atribuições para auxiliar os produtores na detecção de falhas na produção.

## 6. CONCLUSÕES

O levantamento de dados realizado a partir dos registros das análises realizadas pelo SIDB mostrou que a ocorrência de grupos bacterianos nos imunobiológicos é diferente. A partir destes dados foram escolhidos dois imunobiológicos para a realização da análise das amostras bacterianas.

O grupo bacteriano predominante do imunobiológico A foi o BGNF, que não foi identificado no controle ambiental das áreas limpas onde são realizados os ensaios de esterilidade e para o imunobiológico B foi o BGPE que é também encontrado nas áreas citadas.

A análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico utilizando a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) das amostras de *Enterobacter cloacae* provenientes do imunobiológico A mostrou que perfis encontrados em lotes considerados insatisfatórios estavam presentes também em lotes satisfatórios. Estes resultados mostram que a realização do reteste pode ocasionar interpretações equivocadas do ensaio de esterilidade. Esta conclusão está de acordo com as normas oficiais de diversos países que não preconizam mais o reteste no ensaio de esterilidade.

A análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico utilizando a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) das amostras de bastonetes Gram positivos esporulados (BGPE) ambiental demonstra que há uma grande diversidade genética entre as amostras provenientes do imunobiológico B e de controle ambiental.

Com uma exceção, foi observado que apenas uma amostra bacteriana proveniente do imunobiológico B era relacionada com o controle ambiental. Além disso, não houve detecção de contaminação bacteriana em testes de esterilidade concomitantemente aos controles de teste e das áreas limpas. Estes dados sugerem que a contaminação detectada apenas no teste de

esterilidade do imunobiológico pode estar relacionada a algum problema na produção deste imunobiológico.

A determinação do relacionamento genético de amostras bacterianas provenientes de testes e retestes de dois imunobiológicos submetidos ao ensaio de esterilidade empregando a análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico utilizando a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) pode auxiliar e respaldar a interpretação do ensaio de esterilidade e também de avaliar lotes de produtos analisados pelo INCQS/FIOCRUZ.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDON, B. M. Active air vs. passive air (settle plate) monitoring in routine environmental monitoring programs. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**. v. 60, n. 6, p. 350 – 355, 2006.

BIOMERIEUX. **Technical brochure**: biochemical information for identification software: multilingual. Lyon: Marcy L'Etoile, 2000. [150]p., Ref. 41207. Version B. Rev. 10/2000.

BIOMERIEUX. In: Technical bulletin manual industrial. Marcy L'Etoile, Ref. 510722-4. Rev.1002. 435p. 1v. 2002.

BIOMERIEUX. Vitek. In: Manual de referência de microbiologia. Marcy L'Etoile, 2003. 474p. 1v. ( 510759-1PT-A).

BLACKWOOD, K.S., et al. Reassessment of sequence-based targets for identification of *Bacillus species*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p.1626 – 1630, 2004.

BOSSHARD, P. P. et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic Gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation) **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 9, p. 4134-4140, 2003.

BRITISH Pharmacopoeia, 2004. London: The Stationery Office. Appendix XVI A. p. 1-7, 2004.

BRASIL. Lei 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, recuperação da saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 de setembro 1990. Seção 1 p. 018-055.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil, Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 5 de outubro 1988. Seção 1 p. 1 (anexo).

BRASIL. RDC nº 73, de 13 de abril de 2004. Aprova o fascículo 5 da parte II da 4ª edição da Farmacopéia Brasileira. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 de abril 2004. Seção 1, p. 32-88.

BRASIL. RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. Estabelece o regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 de agosto 2003. Seção 1, p. 25-50.

BRITISH PHARMACOPOEIA. Test for Sterility In: BRITISH Pharmacopoeia, Appendix XVI, 2007, A369-373.

BROWN, M. R. W.; GILBERT, P. Increasing the probability of sterility of medicinal products. **Journal of Pharmaceutical and Pharmacology**, v. 29, n. 9, p. 517 – 523, 1977.

BUGNO, A.; PINTO, T. J. A. Comparative study between culture media employed in sterility test. **Bolletino Chimico Farmaceutico**. v. 141, n. 5, p. 367-371, 2002.

CDC. CENTER for Disease Control and Prevention. Follow-up on septicemias associated with contaminated intravenous fluids. **Morbidity and Mortality Weekly Reports**, v. 22, p. 115-116, 1973.

CDC. CENTER for Disease Control and Prevention. **Questions and Answers about Hib Recal**, 2007. Disponível em < <http://www.cdc.gov/vaccines/recs/recalls/hib.recall.faqs-12-12-07.htm>>. Acesso em 10 jul 2008.

CIPRIANO, R. et al., Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the blaSPM clone, spread in hospital. **Microbiology Drug Resistance**, v. 13, n. 2, p. 142-146, 2007.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n.4, p. 840-862, 2004.

COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde**. 2. ed. aum. Ed. São Paulo: SOBRAVIME/ANVS/OPAS, 2004. 494p.

COYLE, M. B.; LIPSKY B. A. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 3, p. 227 – 246, 1990.

CUNDELL, A. M., Microbial identification Strategies in pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 111-123, 2006.

EDQM, European directorate for quality of medicines & health care, 2008 Disponível em <<http://w.w.w..edqm.eu.net.>>. Acesso em: 30 julho 2008.

EIGNER, U. et al. Analysis of comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and Phoenix Systems. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n.8, p. 3829-3834, 2005.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Biological Test: sterility. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. 3. ed. Strasbourg: Council of Europe, 1997, p. 73-75.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Biological Test: sterility. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. 3. ed. Strasbourg: Council of Europe, Supl., 1999, p. 25-28.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Biological Test sterility. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005. v.1. p.145-149.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Biological Test: sterility. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, vol. 1, 2008, p. 155-157.

EUZÉBY, J.P., **List of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN)**. Disponível em <<http://www.bactereo.net>> . Acesso em: 10 jun. 2008.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Métodos Biológicos. Esterilidade. In: FARMACOPÉIA Brasileira. Métodos Biológicos. 4ed. São Paulo: Atheneu, p.v. 5.1.1. 1988.

FELTS, S. K., et al. Sepsis caused by contaminated intravenous fluids. Epidemiologic, clinical and laboratory investigation of outbreak in one hospital. **Annals of Internal Medicine**, v. 77, n. 6. p. 881- 890, 1972

FERNÁNDEZ, C. et al. Nosocomial outbreak of *Burkholderia pickettii* infection due a manufacture intravenous product used in three hospital. **Clinical Infectious Disease**, v. 22, n. 6, p.1092-1095, 1996.

FDA. Food and drug administration. Guidance for Industry. Sterile drugs products produced by aseptic processing – current good manufacturing practice, p. 5, september 2004.

JAPANESE PHARMACOPOEIA. General Test, processes and Apparatus. In:THE JAPANESE Pharmacopoeia. 13 ed. Japan: The Society of Japanese Pharmacopoeia, 2000. Supl. 2, p.1172-1175.

HURST,C .J., et al. **Manual of Enviromental Microbiology**. 2.ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2002. 1138p.

HALLS, N. Effects and causes of contamination in sterile manufacturing In: Microbial Contamination Control in Pharmaceutical Clean Rooms. p. 1-22, 2004a.

HALLS, N. Microbiological environmental monitoring. In: Microbial Contamination Control in Pharmaceutical Clean Rooms. p. 23-51, 2004b.

JIMENEZ, L. Microbial diversity in pharmaceutical products recalls and environments. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 61, n. 5, p. 383-399, 2007.

KATTAR, M. M.; CHAVEZ, J, F.; LIMAYE, A. P.; SWANZY, S.; WOOD, B. L.; COOKSON, B. T. Application od 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 38: 789-794. 2001.

KONEMAN, E. W., et. al. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

KRIEG, N. R.; & HOLT, j. G. **Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 2v.

LA DUC, M. T. et al. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating extreme condition of clean room environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 2600 –2611, 2007.

LAU, S. K. P. et. al. Catheter- related *Microbacterium* bacteremia identified by 16S rRNA gene sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n.—p. 2681- 2685, 2002.

MAKI, D. G. et al. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products.I. Epidemiologic and clinical feature. **The American Journal of Medicine**, v. 60, n. 4, p. 471- 485, 1976.

MANUAL DA QUALIDADE. Procedimento para Isolamento e Caracterização de Bactérias no Setor de Identificação Bacteriana. Rev. 02. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2005. seção 10. 11p. (65.3230.008).

MANUAL DA QUALIDADE. Inoculação dos cartões de identificação no sistema automatizado VITEK 32. rev. 00. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006. Seção 10. 5p. (65.3230.022b)

MANUAL DA QUALIDADE. Utilização do Sistema Semi-Automatizado API (BIOMERIEUX) para Identificação de Bactérias. Rev. 00. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006. Seção 10. 9p. (65.3230.021a).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Parceria Brasil e Argentina: código farmacêutico harmonizado. 12/12/2007. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias>>. Acesso em 30 ago. 2008.

MOLDENHAUER, J.; SUTTON, S. V. W. Towards an improved sterility test. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 58, n.6, p. 284-286, 2004.

MURRAY, P. R. et.al. **Manual of Enviromental Microbiology**. 7.ed. Washington, D.C.: American Society Microbiology, 1999. 1773p.

NAGARKAR, P. P. , RAVETKAR, S. P. , WATVE, M.G. Oligophilic bacteria as tools to monitor aseptic pharmaceutical production units. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1371-1374, 2001.

PATEL, J. B. et al., Sequence-Based identification of aerobic actinomycetes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2530 – 2540, 2004.

PETTI, C. A., POLAGE, C. R.; SCHRECKENBERGER, P. The Role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.12, p. 6123 – 6125, 2005.

PHARMACOPEE FRANÇAISE. Méthodes Biologiques. Stérilité. In: Pharmacopee Française. 10. ed. Paris: ADRAPHARM, 1991. Supl.13.

PINTO, T. J. A. Controle de Produtos Estéreis. In: CONTROLE Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2. Ed. 2002.

OMS. PRUEBAS de Esterilidad. In: ORGANIZACION Mundial De La Salud. Normas generales de Esterilidad para substancias biologicas. Genebra: OMS,1973. ( Serie de Informes Técnicos, 530) p.52-56.

ROSEN, G. **Uma História da Saúde Pública**. 2.ed. São Paulo: Hucitc, 1994. 400p.

ROZENFELD, S.; COSTA, E. A Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: ROZENFELD, S. (Org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. p. 15 – 40.

SCHAFFNER, W.; MELLI, M. A.; KOENIG, M. G. Sepsis caused by contaminated intravenous. Epidemiologic, clinical and laboratory investigation of an outbreak in one hospital. **Annals Internal Medicine**, v. 77,n. 6, p. 881-890, 1972.

SCHOEDER, H. G. Sterility failure analysis. **Journal of Pharmaceutical Science Technology**, v. 59, n. 2, p. 89-95, 2005.

SCHWARTZ, et al. New sprig for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**. v. 47, pt.1, p. 189-195, 1983.

SILVA, A. C. P. O Laboratório Oficial na Avaliação Analítica. In: ROZENFELD, S. (Org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. p.271-301.

SING, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **American Society for Microbiology**. v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SOLL, D. R.; PUJOL. C.; LOCKHART. S. R. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. In: MURRAY, P. R., et al. (Org.). *Manual of Clinical Microbiology*. 9. ed. Washington, Dc: ASM Press, 2007. v. 1 p. 129-151.

STACKEBRANDT, E. et al. Taxonomic Dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. Nov., *Nesterenkonia* gen. Nov., *Kytococcus* gen. Nov., *Dermatococcus* gen. Nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. Emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 682-692. 1995.

SUTTON, S. V.W.; KNAPP, J. E.; PORTER, D. Activities of the USP analytical microbiology expert committee during the 2000-2005 revision cycle. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 59, n. 3, p. 157-176. 2005

SUTTON, S. V. W.; CUNDEL, A. M.; Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. **Pharmacopeial Forum**. v. 30, n. 5, p. 1884 – 1894, 2004

TANG YW, VON GRAEVENITZ A, WADDINGTON M.G., HOPKINS M.K, SMITH D.H., LI H, KOLBERT CP, MONTGOMERY SO, PERSING DH. Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, n. 4, p. 1676-1678:1676-8, 2000.

TEIXEIRA, L.M. et al., Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strain isolated from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n.11 p. 2778-2781, 1997.

THE JAPANESE PHARMACOPOEIA. Sterility Test In: Japanese Pharmacopoeia, thirteenth edition, supplement II, 2000, p. 1172-1175.

THE JAPANESE PHARMACOPOEIA. General Test. Sterility. In: Japanese Pharmacopoeia, fifteenth edition, 2006, p. 93-97

THE UNITED STATE PHARMACOPOEIA. Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments. 26. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Conventional, 2008, CD-ROM. cap. 1116.

THE UNITED STATE PHARMACOPOEIA. Microbiological test. Sterility test. In: United State Pharmacopoeia, volume I, 2007 p. 97-102.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-9. Review, Sep, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18 n. 6, p. 426-439. 1997.

UNITED STATE PHARMACOPEIAL. Microbiological test. Sterility test. In: United State Pharmacopoeia National Formulary, 1990. Rockville, Md., p.1483 - 1488.

UTILIZAÇÃO do Sistema Semi-Automatizado API (BIOMERIEUX) para Identificação de Bactérias. Rev. 00. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006. Seção 10 9p. (65.3230.021).

WHYTE. W. Sterility assurance and models for assessing airborne bacterial contamination. **Journal of Parenteral Science & Technology**, v.40, n.5, p.188-196, 1986.

WHITNEY, J.; GRANDER, M. A. Building automation systems in a pat framework. **Internacional BioPharmaceutical**, september 2005.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **American Society for Microbiology**. v.51, n.2, p.221-271, 1987.