



# TESTES DE ESTERILIDADE INDEPENDENTES DE CRESCIMENTO

Resposta apropriada a um teste de  
esterilidade SCANRDI<sup>®</sup> fora da especificação



PIONEERING DIAGNOSTICS

# Teste de esterilidade independente de crescimento

*Este informativo técnico endereça a resposta apropriada a casos de um teste de esterilidade fora de especificação quando da utilização de um método rápido independente do crescimento como, por exemplo o sistema SCANRDI® que utiliza a técnica de citometria de fase sólida.*

## RESUMO

- O SCANRDI é um método rápido independente de crescimento (RMM) que detecta não apenas células microbianas viáveis que podem ser isoladas com a utilização de caldo ou placa de ágar, mas também células microbianas viáveis e não cultiváveis, o que inclui microrganismos estressados e/ou fastidiosos que podem não ter sido recuperados por métodos de cultura convencionais, o que torna o SCANRDI mais sensível que métodos baseados em crescimento.
- O FDA indica que há aplicações aprovadas para fármacos valendo-se do SCANRDI em testes de esterilidade para a liberação de produtos, ou seja, a tecnologia é aceita na Indústria Farmacêutica.
- Sabe-se que, para fins de identificação microbiana, alguns microrganismos não poderão ser subcultivados a partir de membrana devido ao limitações associadas a meios de cultura tradicionais e parâmetros de incubação ou exposição ao estresse associado ao método.
- Estratégias de retenção de amostras devem ser desenhadas pelo usuário, de modo a permitir reamostragem do mesmo material, na eventualidade de que precisem recuperar os microrganismos após um resultado positivo reportado pelo SCANRDI, visando auxiliar a investigação em casos de falha de esterilidade.
- Regulações atuais de BPF exigem que as falhas em teste de esterilidade sejam investigadas a fim de determinar as suas causas prováveis. Essas investigações podem ser satisfatórias mesmo que não se identifique o microrganismo.

## VISÃO GERAL

O teste de esterilidade baseado em crescimento de acordo com a USP <71> tem um período de incubação mínimo de 14 dias. Isso não é viável para produtos com tempo de prateleira curto ou produtos preparados para uso imediato, incluindo preparações compostas estéreis (CSP). Em dezembro de 2019, a USP <1071> Rapid Microbial Tests for Release of Sterile Short-Life Products: A Risk-Based Approach se tornou oficial. Este capítulo de informações gerais provê as bases para que o *stakeholder* utilize uma abordagem de análise de risco para selecionar o método rápido de esterilidade mais adequado para seu usp pretendido, considerando o tempo de análise, especificidade, limite de detecção, tamanho da amostra, características do produto e segurança do paciente.

Como parte do levantamento de risco, se um fármaco não estéril utilizado na composição, o número de manipulações assépticas, o nível de controle ambiental no local da composição e o volume de produto injetado um infundido devem ser considerados na classificação da CSP como uma preparação de risco baixo, médio ou alto. Como uma CSP terá uma validade curta, a capacidade de completar o teste de esterilidade dentro de 3-4 horas utilizando um método RMM alternativo, rejeitar lotes contaminados e aprovar CSPs adequados sem a necessidade de



conduzir o teste compendial de 14 dias faz com que o fornecimento seja mantido em níveis de estoque e inventário apropriados para atender as necessidades médicas mantendo a segurança do paciente.

RMMs para o teste de esterilidade podem ser dependentes ou independentes do crescimento microbiano. Independentemente do tipo de RMM, todos os produtos farmacológicos devem ser avaliados em termos de compatibilidade com a tecnologia alternativa e validados para demonstrar comparabilidade aos métodos compendiais de acordo com o proposto em USP <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods. Informações Gerais do Chapter <1223> fornecem diretrizes sobre a determinação dos parâmetros de validação recomendados para a validação de métodos de esterilidade qualitativos (presença/ausência), de acordo com a tabela.

| Parâmetro de validação       | Testes qualitativos |
|------------------------------|---------------------|
| Acurácia                     | Não                 |
| Precisão                     | Não                 |
| Especificidade               | Sim                 |
| Limite de Detecção           | Sim                 |
| Limite de Quantificação      | Não                 |
| Linearidade                  | Não                 |
| Faixa de operação (Dinâmica) | Não                 |
| Robustez                     | Sim                 |
| Repetibilidade               | Sim                 |
| Ruggedness                   | Sim                 |
| Equivalência                 | Sim                 |

## SISTEMA SCANRDI®

O SCANRDI é um RMM de citometria de fase sólida que foi validado pelo alcance dos requerimentos da USP <1223> e pode detectar células únicas e viáveis de uma grande gama de bactérias, leveduras e bolores. A descrição da tecnologia e os detalhes de validação foram submetidos ao FDA por via de um Drug Master File (CDER DMF 014621 - TIPO 5). Além disso, vários documentos de validação bioMérieux utilizando o SCANRDI para a testagem de CSPs foram desenvolvidos e disponibilizados às companhias: um reporte primário de validação (BMX.1.076552 version 1.0) provê um resumo dos dados que suportam LOD, Especificidade, Robustez, Ruggedness, e Equivalência. O guia de validação (BMX.1.076403 version 1.0) provê as diretrizes para a viabilidade dos métodos para CSPs

Durante a análise da amostra, o SCANRDI consegue detectar todos os eventos de fluorescência na superfície da membrana, reconhecendo microrganismos marcados graças ao seu algoritmo de discriminação. Este algoritmo é capaz de rejeitar partículas com fluorescência inespecífica, entretanto, dependendo da matriz, ainda pode haver alguns eventos de não-discriminação, com características que requerem a verificação do analista. Os analistas capacitados utilizam um microscópio de fluorescência para isso e as células microbianas viáveis são prontamente diferenciadas por seu formato, tamanho, intensidade e decaimento de fluorescência sob longa exposição durante a microscopia, o que as diferencia em relação ao comprimento de onda de excitação e auto-fluorescência das fibras e partículas que compõem os produtos.

Muitas publicações revisadas nos últimos 25 years documentaram a capacidade do Sistema SCANRDI em detectar microorganismos em soluções filtráveis e produtos solúveis. Estudos mais recentes demonstraram que o Sistema SCANRDI pode enumerar microorganismos viáveis em

água de grau farmacêutico, cloreto de sódio 0,9% injetável, e fármacos oftálmicos (1-4). A tecnologia SCANRDI® conseguiu demonstrar e fornecer resultados consistentes e confiáveis que são numericamente superiores e estatisticamente não inferiores em comparação ao método compendial tradicional para o teste de esterilidade, inclusive em relação ao limite de detecção (4). Os detalhes das submissões regulatórias são confidenciais, entretanto, o FDA reconhece que há aplicações para a liberação de fármacos aprovadas na utilização do SCANRDI, no contexto do teste de esterilidade (5).

#### **Vantagens de uso de métodos independentes do crescimento com Citometria de Fase Sólida:**

- Capacidade de detectar células estressadas e em dormência que, quando cultivadas de forma tradicional, requerem longos tempos de incubação, bem como células fastidiosas às quais normalmente nos referimos como microrganismos viáveis, mas não cultiváveis.
- Independência de limitações associadas a seleção e otimização de meios de cultura e condições de incubação utilizadas pelo método compendial de teste de esterilidade.
- Prevenção em relação a microrganismos que não seriam recuperados ou que crescem de forma lenta, e que poderiam resultar em uma falha na detecção de contaminação quando se usa métodos dependentes do crescimento microbiano.
- O método independente de crescimento não é afetado por antibióticos ou outros ingredientes com atividade antimicrobiana e que podem estar na amostra. Além disso, a possibilidade de ter resultados em cerca de 3h para CSPs: detecção em tempo real e resposta imediata a testes fora da especificação.

#### **Desafios no uso de métodos independentes do crescimento com Citometria de Fase Sólida:**

- Técnicos devem ser capacitados para a verificação microscópica dos eventos detectados pelo sistema. Este desafio é superado por meio de um programa de treinamento interno que poderá incluir treinamentos de atualização no laboratório e oferecidos pela bioMérieux, além de programas de proficiência
- Falta de protocolo que permita subcultivar microrganismos da membrana para fins de identificação de maneira consistente.

## **BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO ATUAIS**

As regulações do FDA sobre os requerimentos de BPF na preparação de fármacos foram estabelecidas pelo 21 CFR partes 210 e 211 do Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. O FDA liberou a revisão 2 das diretrizes para a indústria em Janeiro de 2020 através do: Current Good Manufacturing Practice -Guidance for Human Drug Compounding Outsourcing Facilities sob a Section 503B do FD&C Act (6). As novas diretrizes provêm as condições nas quais o FDA não tomará ações regulatórias acerca de alguns requerimentos de BPF do 21 CFR partes 210 e 211 até que novas regulações específicas dos requerimentos de BPF sejam anunciadas para as *facilities* de fornecimento. O foco deste documento está na parte 211 e que versa sobre a garantia da esterilidade em fármacos estéreis. As recomendações são consistentes com os princípios de BPF e também proveem uma abordagem baseada no levantamento de risco para os requerimentos mais recentes de BPF.

O FDA Guidance for Industry (2020) determina que o teste de esterilidade deve ser conduzido pela utilização do USP <71> Sterility Tests. Qualquer outra metodologia deve ser validada, para o que se recomenda, para fins de orientação, o USP <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods.

## **ESTERILIDADE FORA DA ESPECIFICAÇÃO NO USO DE MÉTODOS COMO O SCANRDI**

Os retornos de nossos clientes mostram que a Section 503B Sterile Compounding Outsourcing Facilities e os laboratórios terceiros que dão suporte a estes sites utilizando o SCANRDI® para o teste de esterilidade tem uma taxa de falhas detectadas da ordem de <0,2%. Isso significa que em mais de 99% do tempo os lotes de produtos estão livres de contaminação e podem ser liberados para administração dentro de 4h. Uma falha de esterilidade, então, é um evento relativamente raro.

É um requerimento atual de BPF realizar investigação quando os testes de esterilidade que detectam falha para determinar a causa mais provável deste evento. Elas devem conter uma revisão dos registros relacionados ao lote, avaliação de todo e qualquer desvio relacionado a produção, análise dos resultados de monitoramento ambiental - inclusive monitoramento de funcionários e análises de tendência, confirmação de eficácia de controles ambientais e revisão de eventos anteriores de falha. A investigação pode, quando possível, também incluir o isolamento e identificação do microrganismo responsável pela falha de esterilidade, o que pode ajudar a determinar a sua origem.

Ainda, o usuário final poderá reamostrar o mesmo material para a execução do teste de esterilidade tradicional visando viabilizar o crescimento das células capturadas. Entretanto, o estresse associado à metodologia pode impedir a recuperação, além de ser difícil garantir a assepsia durante o exame microscópico. A bioMérieux fez numerosos estudos e propôs um método fácil para promover o crescimento após a triagem, a partir de ágar chocolate enriquecido e incubação a 30-35°C por 20-72h (7). Estes estudos se limitam a microrganismos aeróbios e os dados embasam recuperação boa para leveduras, bolores e bactérias Gram +. Bactérias Gram - são mais susceptíveis a dessecação e sua recuperação após a microscopia é mais difícil.

A falta de crescimento microbiano, neste caso, não significa ausência de informação sobre eles. A morfologia dos contaminantes observados ao microscópio nos proverá informação relevante a investigação. Exemplo: bastonetes não esporulados são mais comuns em água enquanto cocos são presentes na pele humana. Leveduras e hifas indicam contaminação fúngica. Mesmo sem a identificação, é possível entregar uma investigação robusta e determinar a causa por trás de um evento de esterilidade fora da especificação.

### **Os documentos de validação da bioMérieux estão disponíveis em:**

- SCANRDI System Primary Validation Report – Compounded Sterile Preparation: doc no. BMX 1.076552 version 1.0 (Data to support Limit of Detection, Specificity, Robustness & Ruggedness)
- SCANRDI System Validation Guide – Method Suitability Testing for Compounded Sterile Preparation: doc no. BMX 1.076403 version 1.0

## REFERÊNCIAS

1. Costanzo SP, Borazjani RN, McCormick PJ. Validation of the SCAN RDI for routine microbiological analysis of process water. *PDA J Pharm Sci Technol* 2002; 56: 206-19.
2. Gressett G, Vanhaecke E, Moldenhauer J. Why and how to implement a rapid sterility test. *PDA J Pharm Sci Technol* 2008; 62: 429-44.
3. Silva GBL, da Silva CM, de SÃi LZSM, Rocha ML, Gil E, de S, Alves VF, Torres IMS. Solid phase cytometry applied to sterility tests for injecting 0.9% sodium chloride. *Afr J Pharm Pharmacol* 2015; 9: 1051-61.
4. Smith R, Tress VM, Tubb C, Vanhaecke E. Evaluation of the ScanRDI as a rapid alternative to the pharmacopeial sterility test method: comparison of the limits of detection. *PDA J Pharm Sci Technol* 2010; 64: 356-63.
5. Parveen S, Kaur S, David SAW, Kenney JL, McCormick WM, Gupta RK. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. *Vaccine*. 2011; 29: 8012-23.
6. Current Good Manufacturing Practice-Guidance for Human Drug Compounding Outsourcing Facilities Under Section 503B of the FD&C Act. Draft Guidance for Industry January 2020 Revision 2 (docket FDA-2014-D-0779).
7. Grosselin J, Palazuelo M, Girard V, Monnin V, Saccomani MC, Wittemberg V, Montero-Julian F. Easy post-scan growth method provides combination of rapid industry relevant microorganisms quantification and identification with ScanRDI and VITEK® MS (poster). 2015 PDA Pharmaceutical Microbiology Conference. Washington DC.