

CONTRÔLE DE ESTERILIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS

Técnica adotada no Instituto Butantan

POR

PLINIO MARTINS RODRIGUES

Ao ser reorganizada, em novembro de 1939, a Secção de Fiscalização de Esterilidade dos produtos químicos e biológicos, fabricados neste Instituto, foi nossa preocupação inicial proceder a um exame da literatura bacteriológica a respeito das técnicas de contrôle em uso nos centros mais adiantados.

O primeiro resultado dessa consulta foi a constatação da inexistência de qualquer padronização de técnica; mesmo entre os americanos do norte, geralmente pioneiros em standardização, era sensível a falta de uniformidade dos processos empregados, quer por organismos oficiais, quer por estabelecimentos industriais de iniciativa particular.

A situação, de inteiro arbítrio por parte de cada fabricante de produtos biológicos e químicos empolados, no que diz respeito à escolha da técnica de contrôle a seguir, acha-se bem descrita num relatório publicado pelo Conselho de Farmácia e Química da "American Medical Association" (1), sem dúvida o melhor trabalho a respeito do assunto que nos ocupa, por nós encontrado na literatura. Não havia nos Estados Unidos, até a época da publicação desse trabalho, fiscalização oficial da esterilidade dos produtos injetáveis postos à venda naquele país. Chegavam mesmo alguns fabricantes, na liberdade que usufruíam, a considerar, em certos casos, como inútil, todo e qualquer contrôle de esterilidade de seus produtos, baseando-se para tanto no poder antisséptico real ou hipotético destes, ou mesmo sem base alguma. A maioria dos industriais, no entanto, submetia os seus produtos, antes da entrega à venda, a um exame cujos detalhes e rigor variavam de caso para caso.

Salientavam, então, os subscritores do relatório referido, a urgência de uma iniciativa por parte do governo, no sentido de ser estabelecido um padrão de técnica para o exame de esterilidade a ser feito regularmente por um organismo oficial.

Com o espirito prático característico de seus compatriotas reconheciam, no entanto, os autores norte-americanos, que faltava ainda a base indispensável para a elaboração de uma técnica ou, talvez, de várias técnicas padronizadas, a serem praticadas em diferentes circunstâncias. Sem dados seguros sobre a incidência de contaminação bacteriana de produtos empolados e — mais importante — sobre a incidência de infecções devidas diretamente à injeção de material empolado, contaminado por bactérias patogênicas, não é prudente, declaram os mesmos, tentar recomendar regras especiais para regulamentação.

Com o fim de facilitar futura padronização, procedeu a mesma comissão a um estudo de classificações de produtos biológicos, propostas por diferentes autores, nas quais eram os mesmos seriados segundo o perigo maior ou menor de contaminação a que estavam sujeitos, devido à sua natureza química ou a suas propriedades antissépticas.

Além dos ensinamentos contidos no relatório citado, cuja leitura é imprescindível para quem queira formar juízo sobre a questão, utilizamo-nos, para o estabelecimento da técnica por nós adotada no Instituto desde novembro de 1939, da prática e dos conselhos dos bacteriologistas da "Division of Laboratories and Research of the New York Department of Health" (2), do "Hygienic Laboratory" do Serviço Nacional de Saúde Pública dos Estados Unidos (3,4), das recomendações do Governo Alemão (5) e, finalmente, da experiência de Arlindo de Assis (6).

Enquanto o "Hygienic Laboratory" e o técnico patricio julgam suficiente o emprêgo de um meio único para cultura de aeróbios e anaeróbios, no volume de 25 a 30 ccs., quer em tubos de Smith, quer em tubos de batata contendo um tubo de hemólise invertido, adotam os outros analistas citados meios diversos para cultura em presença e na ausência de oxigênio.

Ao adotarmos o último critério, assim como ao fixarmos todos os detalhes de técnica que descreveremos a seguir, fomos guiado pela preocupação, natural em serviço de tal responsabilidade, de preferir, quando possível, os processos mais rigorosos, ainda que a custa de grande aumento de trabalho.

DETALHES TÉCNICOS

As provas a que é submetida a quasi totalidade dos produtos podem ser divididas em A) — Prova cultural; B) — Exame bacterioscópico; C) — Prova de inoculação em cobaia.

A) Prova cultural

Meios de cultura utilizados: Como meio básico para cultura de bactérias aeróbias, usamos o caldo soro glicosado a 0,1% como aconselhado por Wadsworth (2) e, para pesquisa de anaeróbios, o meio de fígado de Tarozzi, já utilizado no Instituto Butantan, ao assumirmos a chefia da Secção.

Introduzimos no serviço de controle do Instituto o meio semi-sólido de Hitchens (7), um dos empregados no último laboratório americano citado, capaz de satisfazer às exigências de anaeróbios e aeróbios e, mesmo, de garantir em uma maior porcentagem de casos o desenvolvimento destes (8), quando comparado com o agar comum, graças principalmente às suas características físicas (7). Além dessa vantagem, o meio de Hitchens que se mantém líquido até a temperatura de 45°, possui a de fornecer um processo cômodo para a avaliação, até certo ponto, do grau de contaminação bacteriana, para o estudo de formação de colônias e para a diluição do material a inocular, detalhe este importante quando se trata de produtos adicionados de antissépticos como são em sua quasi totalidade os fabricados pelo Instituto Butantan (9, 10, 11).

Finalmente, como meio próprio ao crescimento de cogumelos, adotamos o Sabouraud líquido (12). Entre todos os trabalhos percorridos, só em (1) encontramos aconselhado o emprego de meios para cultivo de cogumelos, ainda assim apenas para soluções açucaradas. Temos, no entanto, utilizado sem exceção o Sabouraud para todos os produtos. Graças ao seu emprego, pudemos, por ocasião da reforma e pintura do prédio onde estão instaladas as salas de distribuição dos produtos em unidades, descobrir contaminação de diversos produtos com cogumelos. A explicação dessa ocorrência súbita e geral foi facilmente encontrada, graças à experiência de um colega de serviço que já tivera ocasião de observar fato idêntico em uma indústria particular; as faces externas do prédio estavam recobertas por uma camada úmida, na qual eram encontrados cogumelos em cultura pura, disseminados em seguida por todo o interior do edifício, como consequência da raspagem que precedeu à pintura: — Alguns dias de interrupção do serviço de empolamento ou distribuição dos produtos foram suficientes para que cessasse o crescimento geral em Sabouraud.

Serve-nos, ainda, esse meio, mantido em temperatura ambiente, para a descoberta de possível contaminação por bactérias que não crescem ou crescem mal a 37°.

Número de empôlas a serem examinadas: Detalhe importantíssimo de técnica, sobre ele não pode haver, naturalmente, de um ponto de vista teórico, divergência de opinião: tanto maior a porcentagem de unidades examinadas em relação ao número total de unidades da partida, tanto maior confiança inspira o resultado do controle executado. As opiniões devem ser ouvidas, porém,

quando se trata de conciliar a vantagem que oferece, quanto ao rigor do resultado, o emprêgo de um grande número de empôlas, com os inconvenientes de um grande gasto de material e de um aumento exagerado de trabalho, incompatível com os recursos do serviço.

Uma base para a fixação desse número é oferecida pela prática seguida quer no laboratório oficial de Nova York (2) já citado, quer no "Hygienic Laboratory" (3). No primeiro, aconselha-se "examinar 2 unidades quando são distribuídas 100; para cada grupo de 100 empôlas subsequentes examinar uma unidade". No segundo "a proporção de recipientes examinados será de 3 para os lotes contendo até 100 unidades, 4 para aqueles contendo 100 até 150, e assim por diante, adicionando-se um recipiente por 50 ou fração de 50 unidades até 400, limite além do qual o número fixo de 10 será mantido".

Não nos foi possível no Instituto, dados os recursos da Secção, seguir nenhum dos dois critérios citados; atualmente, porém, o número de unidades examinadas, em média, por partida, é maior que o adotado ao assumirmos o serviço, tendo sido nossa preocupação elevá-lo sempre que possível.

Volume do material a ser semeado: A norma seguida foi a de semear a maior quantidade possível de material de cada recipiente, quantidade essa limitada apenas pela necessidade de fazer com que o teor do ácido fênico contido no produto não ultrapasse 1/10.000, depois de feita a diluição do "inoculum" no meio de cultura. Na prática, isto é facilmente conseguido, desde que se padronize, dentro de certos limites, o calibre das pipetas Pasteur usadas. A semeadura do material de diversas unidades permite, além disso, variar o volume líquido inoculado. O detalhe relativo ao volume do material a semear é de importância capital; a sua inobservância pode acarretar o falseamento do controle, resultando a cultura negativa, mesmo quando o produto está contaminado. Substâncias químicas, tais como o ácido fênico, acrescentadas ao produto com fins antissépticos podem não ser suficientes para impedir a multiplicação dos germes de uma contaminação acidental da unidade examinada e, no entanto, ainda capazes, quando não convenientemente diluídos no meio de cultura, de exercer aí sua conhecida ação bacteriostática. Tomamos como base o teor limite de 1/10.000 de ácido fênico — o antisséptico de uso quasi geral nos produtos do Instituto Butantan — apoiando-nos para isso nas pesquisas de Cooper (9, 10) e na prática do laboratório oficial de Nova York [(2), p. 546].

Temperatura e tempo de incubação: Os meios de caldo sôro glicosado, Hitchens e Tarozzi, após semeados, são mantidos em estufa a 37° e o Sabouraud líquido é conservado em temperatura ambiente por 15 dias.

O tempo de cultura adotado pelos diferentes técnicos varia de 5 a 15 dias. Decidimo-nos, no Instituto, pelo prazo maior, tendo em vista uma maior garantia, principalmente no que diz respeito à contaminação por cogumelos. De

48 em 48 horas são examinadas as séries de meios de cultura, sendo repetida a semeadura do material da unidade correspondendo a todo tubo encontrado contaminado; são semeados, então, vários meios idênticos ao contaminado, com líquido da própria unidade já uma vez utilizada, para o que toda empôla é fechada após a retirada do material; no entanto, quando a unidade foi esgotada pela primeira inoculação, é forçoso recorrer a nova semeadura de um grande número de unidades, para apurar si o crescimento observado foi devido à existência de bactérias no produto ou si foi consequência de contaminação acidental alheia ao produto. Uma partida só é dada como contaminada, com base em exame cultural, quando em duas ocasiões diferentes, de duas unidades diversas, são obtidos germes com morfologia idêntica ou, então, já quando da primeira semeadura o número de tubos contaminados é considerável. Pode tornar-se necessário repetição 2, 3 ou mais vezes de uma semeadura para dirimir a dúvida entre contaminação acidental durante a semeadura e contaminação do produto, sendo mesmo difícil em alguns casos resolver a questão (13).

Desejamos ainda aqui citar, de passagem, a utilidade, quando o produto possui qualidades de meio de cultura, da observação de algumas unidades ou de toda a partida durante alguns dias de permanência na estufa.

B) Exame bacterioscópico

Com material de toda partida entregue a controle é feito um esfregaço, corado a seguir pelo método de Gram, para o que, de cada unidade da mesma, são recolhidas algumas gotas em recipiente comum, sendo a lâmina preparada com a mistura final. Conquanto não apresente a mesma garantia que a cultura, o exame bacterioscópico é capaz de revelar a presença de contaminação bacteriana mais ou menos grosseira; serve ainda de complemento ao exame cultural quando este nada possa revelar, isto é, quando o produto esteja contaminado com cadáveres bacterianos.

C) Inoculação em cobaia

A mesma mistura que serviu para o exame bacterioscópico é utilizada para a inoculação de cobaia: são injetados subcutaneamente de 2,5 a 3 ccs. do material, sendo o animal observado durante 5 dias.

No período de mais de um ano, durante o qual temos praticado essa prova, não observamos nos animais inoculados qualquer sintoma consecutivo à injeção, mesmo nos poucos casos, em que se verificou pelo exame cultural, estar o produto contaminado.

Uma vez comprovada, pelas técnicas acima enumeradas, a contaminação do produto, é o mesmo via de regra abandonado; é principalmente o caso das vacinas. Em circunstâncias excepcionais, quando o produto contaminado é dificilmente deteriorável e o crescimento bacteriano é recente e de grau ligeiro, pode o mesmo ser aproveitado após filtração e repetição em grau maior de todas as provas de controle de esterilidade, inocuidade e eficiência. A restrição quanto ao grau e tempo de contaminação é importante, pois, em produtos dotados de propriedades capazes de favorecer o crescimento bacteriano, pode haver produção de toxinas que irão passar através do filtro.

RESULTADO

Em certa ocasião, como dissemos, foi constatada pelo controle a ocorrência súbita de contaminação frequente com cogumelos, em lapso de tempo relativamente curto. Si fizermos abstração desses casos de contaminação, devidos a circunstância excepcional — raspagem da fachada do prédio, então recoberta de uma camada úmida onde abundavam os cogumelos — teremos, como resultado do controle num período de um ano e sete meses, a descoberta de apenas 7 partidas contaminadas, ou sejam aproximadamente 7.000 unidades, num total de 1.050 partidas, correspondentes a cerca de 1.3000.000 unidades. Além desses casos, nos quais a presença de germes no produto foi confirmada em exames repetidos, foram, por motivo de prudência, rejeitadas ainda 4 partidas, por não ter sido possível concluir com segurança sobre a existência ou não de unidades contaminadas entre as mesmas, pois como já acentuamos, não é fácil, em certos casos, apurar a origem da contaminação: si accidental durante a técnica da sementeira ou si realmente do produto. Pela repetição do exame pode não crescer o germe obtido da primeira vez e, em compensação, podem desenvolver-se outras bactérias. O exame de outras unidades não consegue às vezes esclarecer a questão, ficando a dúvida da existência no meio da partida de apenas certo número de empôlas contaminadas.

A ocorrência de tais fatos esclarece bem o conceito em que deve ser tida a garantia oferecida pelo controle de esterilidade. A simples consideração, além de outras, da impossibilidade prática de ser examinada toda a partida, basta para demonstrar à sociedade, não poder o controle de esterilidade, realizado após a distribuição do produto em unidades, oferecer uma garantia absoluta. As unidades a serem examinadas são colhidas por entre a massa da partida, sendo ainda utilizadas a primeira e a última distribuídas. Está claro, que, ao assim proceder, é impossível evitar a influência do acaso, que, aliás, é suscetível de ser calculada com uma certa margem de erro.

A afirmação da esterilidade de produtos biológicos não pode repousar apenas sobre a execução de provas de controle, por mais rigorosas que sejam; é

toda uma série de cuidados técnicos iniciados com o preparo químico do medicamento ou, no caso dos sôros terapêuticos, com a sangria do animal, e observados cuidadosamente durante todo o processo mais ou menos complicado, segundo o caso, de sua feitura, até a distribuição final em unidades, que fornece a garantia da esterilidade de um produto, garantia que o controle não faz mais que sancionar e reforçar.

BIBLIOGRAFIA

1. Council of Pharmacy and Chemistry-American Medicin Association. Report on Sterility of Ampoule Preparations. — J. A. M. A. 103:678.1934.
2. *Wadsworth, A. B.* — Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health, 2.^a ed., Baltimore, 1939.
3. *Magalhães, Mario* — Organização, administração e técnicas de laboratório de Saúde Pública. Partes II e III — Arch. de Hyg., Rio de Janeiro, 4(1):211.1930.
4. Memorial of details, under Section 36, Regul. of Biol. Products — U. S. Public Health Service (Hygienic Laboratory) Miscellaneous Publication No. 10, 1st August, 1923.
5. Vorschriften für die staatliche Prüfung der Gasbrand (perfringens) Sera — Ministeriumblatt des Reichs- und Preuss. Ministeriums des Innern 15:591.1937.
6. *Assis, Arlindo de* — Técnica simples para as provas de esterilidade — Arch. do Inst. Vital Brazil 4(1):83.1926.
7. *Hitchens, A. P.* — Advantages of culture mediums containing small percentages of agar — Jour. Infect. Dis. 29:390.1921.
8. *Falk, C. R.; Bucca, H. B. & Simmons, M. P.* — A comparative study of the use of various concentrations of agar in the test mediums used to detect contaminants in biologic products — Journ. of Bacter. 37(2):121.1939.
9. *Cooper E. A. & Forstner* — Studies on selective bactericidal action — Bioch. Jour. 18:941.1924.
10. *Cooper, E. A. & Mason, J.* — Studies on selective bactericidal action — Jour. Hyg. (Camb.) 26:118.1927.
11. *Neill, M. H.* — Studies in preservatives of biological products — Hyg. Lab. Bull. (112):37.1918
12. *Besson, A.* — Technique Microbiologique et Sérothérapique, 7.^a ed., Paris, 1924, p. 1203.
13. *Bengtson, I. A.* — The nature of contaminations of biological products — Hyg. Lab. Bull. (112):14.1918.

(Trabalho do Laboratório de Controle e Tuberculose. Entregue para publicação em 8 de setembro de 1941 e dado à publicidade em janeiro de 1942.)

