



Correspondência do Autor

¹ Universidade Estadual de Campinas
Hemocentro
Campinas, SP - Brasil
suireis@unicamp.br

Validação dos controles microbiológicos para produtos de terapia celular utilizando meios de cultura padrões e frascos de hemocultura¹

Suiellen Carvalho Reis Alves ¹ Andréa Frizzo 
Alexandra Greco Aguiari  Eliane Picoli Alves Bensi 
Patricia Cristiane Spirlandelli Teixeira 
Cristiane dos Santos Cruz Piveta 
Sandra de Andrade Sousa Martins  Fabrício Bíscao Pereira 
Bruno Deltreggia Benites 

Resumo

Introdução: Introdução: O teste de esterilidade para produtos de células progenitoras hematopoiéticas (CPH) para uso clínico é um requisito regulamentar exigido pelas normas vigentes e pelas principais organizações de acreditação para terapia celular. Contudo, não há orientações sobre a metodologia que deve ser adotada, volume de amostra adequado para os ensaios, além dos critérios para validação, que deve demonstrar que o método adotado para análise microbiológica é confiável. **Objetivo:** Padronizar o uso de frascos de hemocultura para produtos de terapia celular demonstrando a não inferioridade deste método alternativo frente ao método tradicional indicado pela farmacopeia brasileira. **Metodologia:** Para este estudo foram realizadas inoculações para ensaios microbiológicos de CPH, tanto de controle negativo como de controle positivo, em: Cultura aeróbia: frasco para hemocultura pediátrico e meios de cultura Tioglicolato, Ágar Sangue e Ágar Chocolate. Cultura anaeróbia: frasco para hemocultura anaeróbio e meio Tioglicolato. Cultura fúngica: frasco para hemocultura pediátrico e meio de cultura Sabouraud. Foi analisado o grau de concordância entre os resultados dos ensaios obtidos nos diferentes meios. **Resultados:** Todas as culturas realizadas concomitantemente à rotina apresentaram resultados negativos em todos os meios analisados assim como as culturas destinadas para controle positivo apresentaram concordância perfeita entre todos os meios analisados. **Conclusão:** As análises microbiológicas em frascos de hemoculturas mostraram-se eficazes e rápidas,

¹ Esse trabalho foi publicado primeiramente no 9º Simpósio dos Profissionais da UNICAMP (Campinas, nov. 2024) sob o eixo "Saúde", sendo adaptado para a seção "Comunicação" da Revista Saberes Universitários.

demonstrando a não inferioridade deste método alternativo frente aos métodos tradicionais utilizando os diferentes meios de cultura.

Palavras-chave

Validação. Contaminação Microbiológica. Transplante de Medula Óssea.

Validation microbiological controls for cell therapy products using standard culture media and blood culture bottles

Abstract

Introduction: The sterility test for haematopoietic progenitor cell (HPC) products for clinical use is a regulatory requirement demanded by current standards and the main accreditation organisations for cell therapy. However, there is no guidance on the methodology that should be adopted, the appropriate sample volume for the tests, as well as the criteria for validation, which must demonstrate that the method adopted for microbiological analysis is reliable. **Objective:** To standardise the use of blood culture vials for cell therapy products by demonstrating the non-inferiority of this alternative method compared to the traditional method indicated by the Brazilian pharmacopoeia. **Methodology:** For this study, inoculations were carried out for microbiological testing of CPH, both negative and positive control, were carried out in: Aerobic culture: paediatric blood culture bottle and Thioglycolate, Blood Agar and Chocolate Agar culture media. Anaerobic culture: anaerobic blood culture bottle and thioglycolate medium. Fungal culture: paediatric blood culture bottle and Sabouraud culture medium. The degree of agreement between the results of the tests obtained on the different media was analysed. **Results:** All the cultures carried out concurrently with the routine showed negative results in all the media analysed, while the cultures intended for positive control showed perfect agreement between all the media analysed. **Conclusion:** Microbiological analyses on microbiological analyses on blood cultures proved to be effective and rapid, demonstrating the non-inferiority of this alternative method compared to traditional methods using different culture media.

Keywords

Validation. Microbiological Contamination. Bone Marrow Transplantation.

CRediT

Reconhecimentos: Não aplicável.

Financiamento: Não aplicável.

Conflitos de interesse: O autor certifica que não tem interesse comercial ou associativo que represente um conflito de interesses em relação ao manuscrito.

Aprovação ética: Não aplicável.

Disponibilidade de dados e material: Não aplicável

Contribuições dos autores: Conceitualização: Curadoria de dados: Análise formal: Aquisição de financiamento: Investigação: Metodologia: Administração do projeto: Recursos: Software: Supervisão: Validação: Visualização: Escrita – rascunho original: Escrita – revisão & edição: ALVES, S. C. R.; FRIZZO, A.; AGUIARI, A. G.; BENSI, E. P. A.; TEIXEIRA, P. C. S.; PIVETA, C. S. C; MARTINS, S. A. S.; PEREIRA, F. B. e BENITES, B. D.

Imagem: Extraída do Currículo Lattes

ODS3 – Saúde e Bem-estar



1 INTRODUÇÃO

O transplante de medula óssea é uma opção de tratamento padrão para muitas doenças hematológicas malignas. Geralmente, no processo de coleta, processamento, armazenamento e distribuição de células progenitoras hematopoiéticas (CPH), várias equipes de trabalho estão envolvidas de modo que muitos protocolos de boas práticas devem ser seguidos para garantir a qualidade e a segurança do produto (Hirji, 2003; Almeida, 2010).

Apesar da literatura demonstrar que a taxa de contaminação microbiológica dos produtos de transplante é baixa, a depender do microrganismo pode haver consequências médicas severas para o transplantado (Hirji, 2003; Anneaux 2007; Dal, 2016).

Uma vez que o processamento do produto, seja para criopreservação ou para remoção de plasma ou hemácias, pode constituir uma fonte potencial de contaminação microbiológica, o teste de esterilidade para produtos de terapia celular para uso clínico é um requisito regulamentar exigido pela RDC n° 836/2023 art.47, assim como as principais organizações de acreditação para terapia celular (AABB - Association for the Advancement of Blood and Biotherapies e FACT - Foundation for the Accreditation of Cellular Therapies). (Almeida,2010; Cundell,2023; RDC 836/23)

A RDC 836/2023 orienta que os testes microbiológicos para detecção de contaminação bacteriana (aeróbica e anaeróbica) e fúngica (leveduras e fungos filamentosos), devem ser realizados, no mínimo, em amostras do produto pós-processamento e antes da criopreservação, antes ou após a adição de crioprotetores. Já o padrão da AABB para terapias celulares define como esterilidade uma condição asséptica que significa ausência de microrganismos vivos e indica a cultura para bactérias aeróbicas e anaeróbicas e para fungos na conclusão do processamento. Contudo, não há orientações sobre o volume de amostra adequado, metodologia apropriada e critérios de validação (Cundell,2023).

Visto que os teste de esterilidade de CPH seguem as boas práticas em células humanas, assume-se que a metodologia empregada deve seguir as diretrizes da farmacopeia brasileira (FB), uma vez que a mesma é referenciada na Resolução da Diretoria Colegiada N° 836/2023. Os ensaios microbiológicos tradicionais são eficientes, simples e de baixo custo, contudo para aplicação em produtos de terapia celular apresentam algumas limitações como resultado tardio, baixa seletividade do meio de cultura e variabilidade da resposta biológica dos microrganismos (FB, 2019; Cundell, 2023).

Os ensaios microbiológicos alternativos são contemplados na farmacopeia brasileira e apresentados como uma opção de melhoria na qualidade dos testes, maior sensibilidade e resultados mais rápidos, possibilitando que ações corretivas sejam tomadas precocemente. Entretanto, faz-se necessário uma validação, para demonstrar a não inferioridade entre esses métodos e o tradicional (FB, 2019).

Na escolha do ensaio deve-se considerar sua aplicação e a compatibilidade com o produto a ser analisado, além de ser adequado à rotina. Visando esta questão, para este estudo foi selecionado o método de detecção da produção ou consumo de gás, utilizando frascos de hemocultura com análise automatizada através da tecnologia de detecção de fluorescência (FB, 2019; Cundell, 2023).

A validação deve assegurar que o método adotado para análise microbiológica é confiável. Assim, o objetivo desta validação foi padronizar o uso de frascos de hemocultura para produtos de terapia celular demonstrando a não inferioridade deste método alternativo frente ao método tradicional utilizando os diferentes meios de cultura.

Os critérios de aceitação para esta validação foram:

- Os resultados da cultura aeróbia em frasco pediátrico devem ter concordância perfeita, de acordo com o coeficiente Kappa, com os resultados obtidos nas culturas semeadas em caldo Tioglicolato, Ágar Sangue e Ágar Chocolate.

- Os resultados da cultura anaeróbia em frasco de hemocultura anaeróbio devem ter concordância perfeita, de acordo com o coeficiente Kappa, com os resultados das culturas semeadas em caldo Tioglicolato
- Os resultados de cultura fúngica em frasco para hemocultura pediátrica devem ter concordância perfeita, de acordo com o coeficiente Kappa, com os resultados das culturas semeadas em ágar Sabouraud.
- Os resultados das culturas realizadas em amostras contaminadas para controle positivo devem ter concordância perfeita, de acordo com o coeficiente Kappa, com os resultados compatíveis com as cepas inoculadas.

2 METODOLOGIA

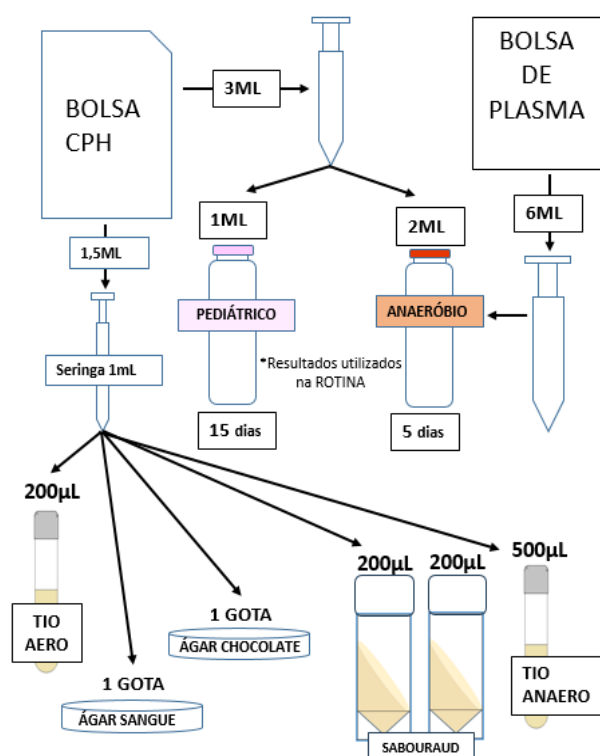
Todas as coletas foram recepcionadas e inspecionadas conforme técnica padronizada da rotina do laboratório. As coletas incluídas nesta validação atenderam aos critérios de inclusão proposto e apresentaram células suficientes para que fosse possível retirar amostra para realização do ensaio microbiológico de controle negativo e controle positivo atendendo as condições de amostra fresca e pós-processamento com crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO).

As amostras foram manipuladas em capela de fluxo laminar Classe II Tipo B2 previamente preparada no Laboratório de Processamento Celular e encaminhadas para incubação no Setor de Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas - Unicamp, conforme protocolo de semeadura já estabelecido na rotina.

De forma simultânea e concorrente com a rotina, foram inoculadas 10 amostras de produtos frescos e 10 amostras de produtos processados com adição de DMSO. Foi realizada a inoculação para ensaio microbiológico nas seguintes culturas:

- Cultura aeróbia: frasco para hemocultura pediátrico e meios de cultura Tioglicolato, Ágar Sangue, Ágar Chocolate. O tempo de incubação dos meios de cultura e das placas é de 72 horas.
 - Cultura anaeróbia: frasco para hemocultura anaeróbio e meio Tioglicolato. O tempo de incubação dos meios de cultura e das placas é de 72 horas.
 - Cultura fúngica: frasco para hemocultura pediátrico e meios de cultura Sabouraud. O tempo de incubação dos meios de cultura e das placas é de 30 dias.
- As inoculações ocorreram conforme esquema abaixo:

Figura 1: Diagrama de inoculação do produto de terapia celular nos seus respectivos meios para controle negativo.



Fonte: Elaborada pelo(a) autor(a), (2024).

A validação do controle da cultura positiva foi realizada com 10 amostras, sendo 5 de produtos frescos e 5 de produtos processados com adição de DMSO.

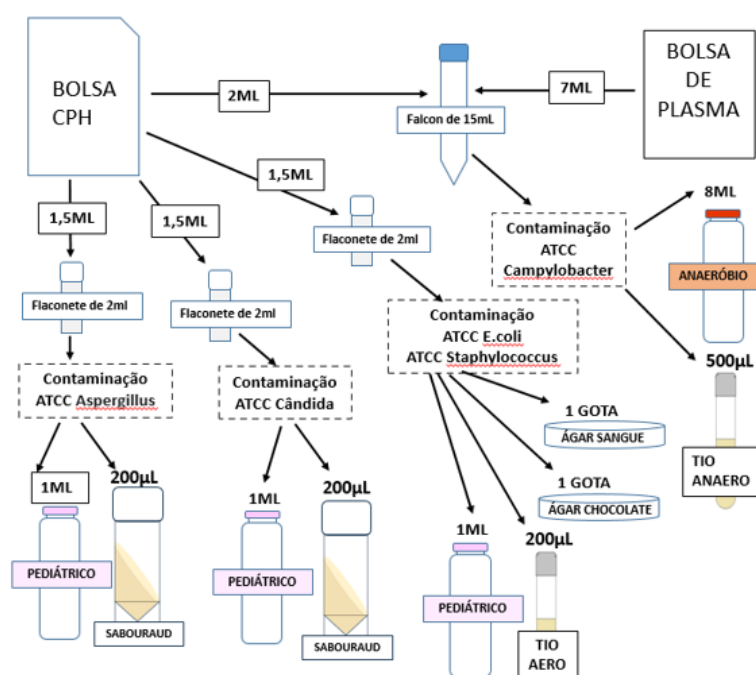
Para esta etapa do protocolo de validação foram utilizadas as seguintes cepas ATCC: para cultura aeróbica Cepa ATCC 25922 *Escherichia coli* e Cepa ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*; cultura anaeróbia Cepa ATCC 33291 *Campylobacter jejuni*; cultura fúngica de levedura Cepa ATCC 90028 *Candida albicans*; cultura fúngica de filamentosos Cepa ATCC 204305 *Aspergillus fumigatus*. A Cepa ATCC 33291 *Campylobacter jejuni* apresentou problema durante o processo.

Três culturas de controle positivo não apresentaram crescimento no frasco anaeróbico e nem no meio tioglicolato, o que acarretou na substituição do microrganismo pelo *Clostridium sp* referência ID MALDI 4120697003. Foram incluídas mais três amostras para substituir estas que não apresentaram positividade.

As diluições, contaminações, bem como as inoculações e sementeiras destas culturas positivas foram realizadas no Setor de Microbiologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas – Unicamp.

Os inóculos foram preparados a partir da solução de 0,25 na escala MacFarland ($1,5 \times 10^4$ UFC). Foi realizada diluição 1:1 com salina, para obter uma concentração de ($1,5 \times 10^2$ UFC) (Luzzi, 2022). Foi inoculado 50 µL das suspensões preparadas nos flaconetes/tubos de produto de células progenitoras fornecidas pelo Laboratório de Processamento Celular. O volume total foi aspirado com uma seringa estéril, semeado e incubado conforme figura 2, seguindo os protocolos padronizados do setor de microbiologia.

Figura 2: Diagrama de contaminação e inoculação das diferentes cepas ATCC nos seus respectivos meios.



Fonte: Elaborada pelo(a) autor(a), (2024).

Análise de dados:

Os resultados das culturas aeróbias, anaeróbias e fúngicas foram tabelados e analisados em software SPSS15, quanto à conformidade aos critérios de aceitação propostos.

Foi utilizado o coeficiente Kappa para análise dos resultados e a interpretação foi baseada na classificação proposta por Landis e Koch (1977) que classificam os diferentes níveis de concordância (ou reprodutibilidade) conforme mostra tabela abaixo:

Quadro 1. Nível de concordância coeficiente Kappa

COEFICIENTE KAPPA	NÍVEL DE CONCORDÂNCIA
<0	Não existe Concordância
0 - 0,20	Concordância Mínima
0,21 - 0,40	Concordância Razoável
0,41 - 0,60	Concordância Moderada
0,61 - 0,80	Concordância Substancial
0,81 - 1,0	Concordância Perfeita

Fonte: Landis, (1977)

Amostragem: Foram utilizadas neste estudo 20 amostras de produtos de terapia celular, sendo que 10 para utilização a fresco e 10 processadas para criopreservação, contendo DMSO.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esta validação foi realizada no período de 07/03/2024 a 22/04/2024 e durante a mesma todos os equipamentos utilizados estavam com suas calibrações e/ou manutenções preventivas em dia, bem como todos os insumos estavam dentro do prazo de validade, conforme descrito acima.

Foram realizados 30 ensaios de cultura aeróbia em frascos de hemocultura pediátrico, meio de cultura em tioglicolato, semeadura em ágar sangue, semeadura em ágar chocolate. As 20 culturas realizadas concomitante com a rotina apresentaram resultados negativos em todos os meios analisados. As 10 culturas destinadas para controle positivo apresentaram positividade e crescimento do microrganismo semeado em 100% das amostras analisadas.

Tabela 1: Análise aeróbia – frasco de hemocultura pediátrico e meio de cultura tioglicolato.

		Meio de Cultura Tioglicolato		
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
Frasco Hemocultura Pediátrico	NEGATIVO	20	0	20
	POSITIVO	0	10	10
	TOTAL	20	10	30

Fonte: Elaborada pelo(a) autor(a), (2024).

Tabela 2: Análise aeróbia – frasco de hemocultura pediátrico e semeadura em ágar sangue.

		Semeadura Ágar Sangue		
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
Frasco Hemocultura Pediátrico	NEGATIVO	20	0	20
	POSITIVO	0	10	10
	TOTAL	20	10	30

Fonte: Elaborada pelo(a) autor(a), (2024).

Tabela 3: Análise aeróbia – frasco de hemocultura pediátrico e semeadura em ágar chocolate.

		Semeadura Ágar Chocolate		
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
Frasco Hemocultura Pediátrico	NEGATIVO	20	0	20
	POSITIVO	0	10	10
	TOTAL	20	10	30

Fonte: Elaborada pelo(a) autor(a), (2024).

O teste de Kappa demonstrou que há concordância perfeita, tanto no controle negativo como no controle positivo, entre os resultados das culturas aeróbias em:

- Frasco de hemocultura pediátrico com meio de cultura em tioglicolato (K:1; $p < 0,0001$);
- Frasco de hemocultura pediátrico com semeadura em ágar sangue (K:1; $p < 0,0001$);
- Frasco de hemocultura pediátrico com semeadura em ágar chocolate (K:1; $p < 0,0001$);
- Nos 10 casos de controle positivo, o frasco de hemocultura pediátrico positivou no tempo médio de 4h38min, com tempo máximo de 5h29min e tempo mínimo de 4h03min, compatíveis com as cepas inoculadas.

Foram realizados 30 ensaios de cultura anaeróbia em frascos de hemocultura anaeróbio, meio de cultura em tioglicolato. As 20 culturas realizadas concomitante com a rotina apresentaram resultados negativos em todos os meios analisados. Das 13 culturas destinadas para controle positivo, 10 apresentaram positividade e crescimento do microrganismo semeado em 100% das amostras analisadas e 3 foram negativas nos dois meios analisados e por isso o microrganismo foi substituído.

Tabela 4: Análise anaeróbia – frasco de hemocultura anaeróbio e meio de cultura tioglicolato.

		Meio de Cultura Tioglicolato		
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
Frasco Hemocultura Anaeróbio	NEGATIVO	23	0	23
	POSITIVO	0	10	10
	TOTAL	23	10	33

Fonte: Elaborada pelo(a) autor(a), (2024).

O teste de Kappa demonstrou que há concordância perfeita entre os resultados da cultura anaeróbia em:

- Frasco de hemocultura anaeróbio com meio de cultura em tioglicolato (K:1; $p < 0,0001$);
- Nos casos de controle positivo, o frasco de hemocultura anaeróbio positivou no tempo médio de 9h02min, com tempo máximo de 17h56min e tempo mínimo de 4h19min, compatíveis com a cepa inoculada.

Foram realizados 30 ensaios de cultura de fungos em frascos de hemocultura pediátrico, meio de cultura Saboraud. As 20 culturas realizadas concomitante com a rotina apresentaram resultados negativos em todos os meios analisados. As 10 culturas destinadas para controle positivo apresentaram positividade e crescimento do microrganismo semeado em 100% das amostras analisadas, tanto para controle positivo de fungos filamentosos como para levedura.

Tabela 5: Análise cultura fungos – frasco de hemocultura pediátrico e meio de cultura Saboraud.

		Meio de Cultura Saboraud			TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO LEVEDURA	POSITIVO FILAMENTOSO	
Frasco Hemocultura Anaeróbio	NEGATIVO	20	0	0	20
	POSITIVO	0	10	10	20
	TOTAL	20	10	10	40

Fonte: Elaborada pelo(a) autor(a), (2024).

O teste de Kappa demonstrou que há concordância perfeita entre os resultados da cultura de fungos, tanto de levedura como de filamentosos em:

- Frasco de hemocultura pediátrico com meio de cultura em Sabouraud (K:1; $p < 0,0001$);
- Nos casos de controle positivo, o frasco de hemocultura pediátrico para levedura positivou no tempo médio de 12h23min, com tempo máximo de 14h07min e tempo mínimo de 10h34min.
- Nos casos de controle positivo, o frasco de hemocultura pediátrico para filamentosos positivou no tempo médio de 17h47min, com tempo máximo de 19h17min e tempo mínimo de 16h06min, compatíveis com as cepas inoculadas.

4 CONCLUSÃO

As análises microbiológicas em frascos de hemoculturas mostraram-se eficazes e rápidas, demonstrando a não inferioridade deste método alternativo frente aos métodos tradicionais utilizando os diferentes meios de cultura.

Os testes microbiológicos utilizados nesta validação demonstraram concordância perfeita entre eles para detecção de contaminação bacteriana (aeróbica e anaeróbica) e fúngica (leveduras e fungos filamentosos) dos produtos de terapia celular sem processamento (frescos) e pós-processamento (com adição de DMSO), cumprindo desta forma os critérios de aceitação propostos.

Tanto para cultura aeróbia, anaeróbia e de fungos, a inoculação em frascos de hemocultura mostrou-se um método rápido e eficaz para detecção de microrganismos aeróbios, anaeróbios, e de leveduras e fungos filamentosos sendo indicado para uso de forma segura na rotina do laboratório de processamento celular.

A cultura em meio de cultura em tioglicolato, semeadura em ágar sangue, semeadura em ágar chocolate, meio de cultura Sabouraud também são eficazes e podem ser considerados como meio de contingência no caso de desabastecimento de algum frasco de hemocultura.

10

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, ID; COITINHO, AS; JUCKOWSKY, CA; SCHMALFUSS, T; BALSAN, AM; RÖHSIG, LM. Controle de esterilidade de produtos de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo. v. 32. n1. P. 23–28, fevereiro 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010005000003>.

ANNEAUX, V.; FOÏS, E.; ROBIN, M.; *et al.* Microbial contamination of BM products before and after processing: a report of incidence and immediate adverse events in 257 grafts. **Cytotherapy**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 508-513, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240701420427>.

BRASIL. [RDC N° 836 (2023)]. **Resolução da Diretoria Colegiada N° 836 de 13 de dezembro de 2023**. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, [2023]. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6633884/RDC_836_2023_.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopeia Brasileira, volume 1**. 6ª Ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, [2019] Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>.

CUNDELL, T; ATKINS, JW; LAU, AF. Sterility Testing for Hematopoietic Stem Cells. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 61 n. 3, p. e0165422, março 2023 DOI:

10.1128/jcm.01654-22.

DAL, Mehmet Sinan; TEKGÜNDÜZ, Emre; *et al.* Does microbial contamination influence the success of the hematopoietic cell transplantation outcomes? **Transfusion And Apheresis Science**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 125-128, ago. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2016.05.001>.

HIRJI, Zahir; SARAGOSA, Ronnie; *et al.* Contamination of Bone Marrow Products with an Actinomycete Resembling Microbacterium Species and Reinfusion into Autologous Stem Cell and Bone Marrow Transplant Recipients. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 36, n. 10, p. 115-121, 15 maio 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/374051>.

LUZZI, Jr; CALHEIROS, Wv; LIRA, Ao; SILVA, Ml; PLAZZA, Ranx. Modelo de validação para a detecção microbiológica pelo sistema BD BACTEC FX top para concentrado de plaquetas e de hemácias. **Hematology, Transfusion And Cell Therapy**, [S.L.], v. 44, p. 486-487, out. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.831>.

LANDIS, JR; KOCH, GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. vol. 33 n. 1 p. 159-74, 1977.