

Challenge Test e Uso de Cepas de referência

Palestrantes:

Meire Ota

Tatiana Cinquetti

Zayana Teixeira



GENETIK

Sobre o Vila Vicentina de Campo Belo (MG)

A Vila Vicentina de Campo Belo é muito mais do que uma instituição: é um espaço construído com acolhimento, cuidado e dedicação ao próximo. Há décadas, a entidade realiza um trabalho social voltado ao cuidado de idosos, oferecendo proteção, dignidade e um ambiente de convivência baseado no respeito e no carinho. Em cada história, visita e gesto de solidariedade, fica evidente que cuidar também é uma forma de transformar vidas




Você PRECISA conhecer essa VILA VICENTINA – Tiago Lopes

Veja o vídeo completo clicando [aqui](#).



Experiência na área, com foco específico em Desenvolvimento de Microbiologia para produtos de Higiene Oral e Cosméticos (Cuidado Orais) em empresas multinacionais de grande porte. Experiência extensiva em auditoria de Primeira e Segunda parte, requisitos de Boas Práticas de Fabricação (GMP), ISO/IEC 17025 e Design Sanitário, para avaliação do risco microbiológico em sites de manufaturas terceiras de cosméticos, fornecedores de matérias-primas, e de embalagem.

 tfc.consultoriamicro@gmail.com



11 96074-5860



Tatiana Fonseca Cinquetti





Zayana Vilela Teixeira

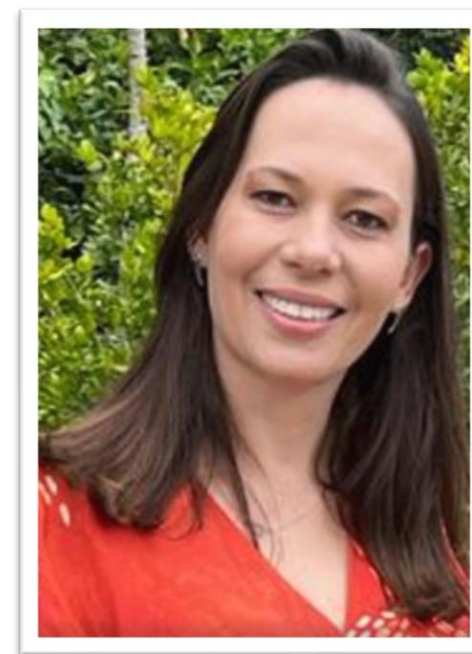
Gerente Técnico-Comercial na empresa Genetik

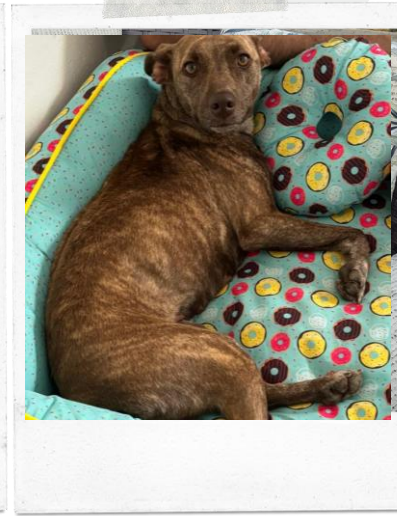
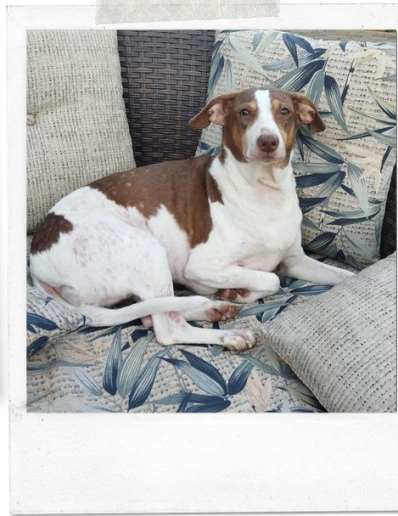
Mais de 20 anos trabalhando na área Técnica e Comercial

Graduação em Farmácia Industrial pela Universidade São Judas Tadeu

Pós graduação em Administração e Marketing Faculdades Oswaldo Cruz

Especialização em Microbiologia Industrial pela Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM)





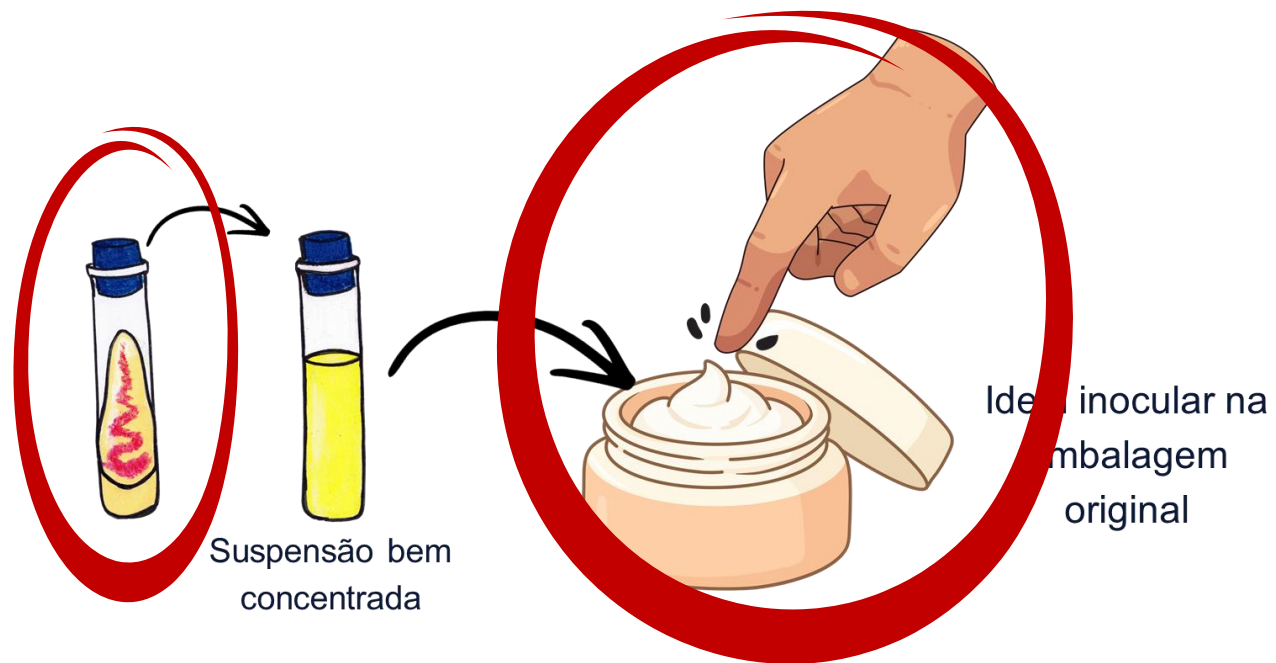
Meire Ota

Formada em Ciências Biológicas com Mestrado em Microbiologia Molecular, possui 16 anos de experiência na indústria farmacêutica, atuando nas áreas de Controle de Qualidade e Pesquisa e Desenvolvimento Microbiológico.

Ministra cursos e palestras há mais de 10 anos. Casada com o Gui e tutora da Lily e da Hashi. A Lily acha que é gente e a Hashi é fofoqueira!

Sobre a palestra de hoje

Não confunda o challenge test com contagem microbiana. Enquanto na contagem queremos saber quanto de contaminação há na amostra, o challenge verifica a capacidade do sistema conservante.



Esse ensaio é essencial, principalmente para produtos que são multidose ou que o consumidor mantém aberto ou toca muitas vezes, como um creme em pote.

O que é um Material de Referência Certificado (MRC) ?

Material de referência caracterizado por um procedimento metrologicamente validado para uma ou mais propriedades especificadas.

- Nota 1 Acompanhado por um certificado que forneça o valor da propriedade especificada
- Nota 2 Sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica
- Nota 3 Homogêneo
- Nota 4 Estável
- Nota 5 Pronto para o uso, podendo ser Qualitativos ou Quantitativo
- Nota 6 Possui uma cadeia contínua documentada de calibrações



Accredited Reference Material Producer

A2LA has accredited

REMEL, INC., PART OF THERMO FISHER SCIENTIFIC *Lenexa, KS*

This accreditation covers the specific materials listed on the agreed upon Scope of Accreditation. This producer meets the requirements of *ISO 17034:2016 General Requirements for the Competence of Reference Material Producers*. This accreditation demonstrates technical competence for a defined scope and the operation of a quality management system.

Presented this 14th day of November 2022.



A blue ink signature of a person, likely the Vice President of Accreditation Services, written over a horizontal line.

Vice President, Accreditation Services
For the Accreditation Council
Certificate Number 6559.01
Valid to August 31, 2024

For reference materials to which this accreditation applies, please refer to the reference material producer's Scope of Accreditation.

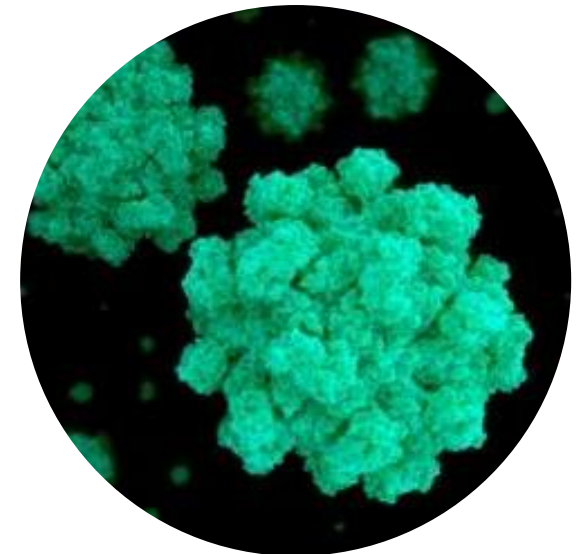
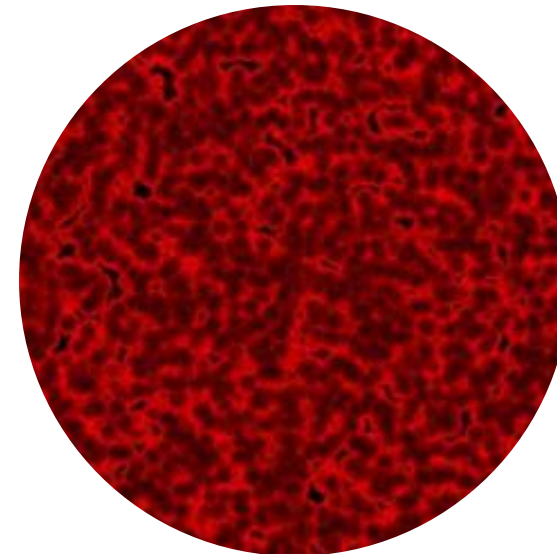
O que buscar?

Autenticação:

- Fontes de materiais de referência (Farmacopéias, Standard Methods, ISO, CLSI, EUCAST...)
- Coleções de Cultura Certificadas (por exemplo ATCC, NCTC)
- Prestadores Comerciais Certificados (por exemplo Thermo Fisher Scientific)

Considerações:

- Confiável (qualidade)
- Rastreável
- Acessível
- Conveniente

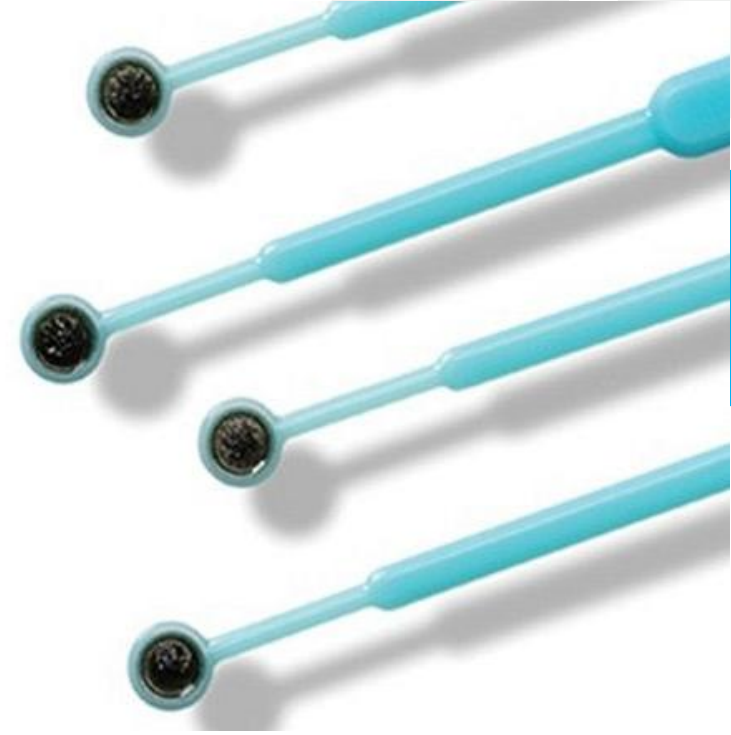


Cepas Qualitativas



Thermo Scientific™ Culti-Loops™

- Loops bacteriológicos prontos para uso contendo microrganismos viáveis e estáveis em uma matriz de gel única
- Organismos derivados e licenciados da ATCC™
- Material de Referência Certificado ISO 17034
- Mais de 400 microrganismos (MRC) disponíveis em linha



ATCC Licensed
Derivative



Thermo Scientific™ Culti-Loops™

- **Apresentação:** conjunto de 5 alças (embaladas individualmente)
- **Rendimento:** 30 placas por alça*
- **Nº de passagens:** à partir da 3ª da original ATCC
- **Armazenamento:** de 2° à 8°C

ATCC Licensed
Derivative



* Rendimento aproximado, considerando o protocolo de manutenção de estoque sugerido pelo fabricante.
Fonte: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/brochures/QC-Stock-Culture-Maintenance-Protocol-EN.pdf>

Thermo Scientific™ Culti-Loops™

1

Abrir o pacote



2

Aplicar no ágar quente



3

Incubar



- Formato de loop (alça bacteriológica):
 - Pronto para uso
 - Não requer hidratação
 - Fácil de usar
 - Manipulação zero de microrganismo
- Redução de risco de contaminação
- Redução de tempo e custos

Thermo Scientific™ Culti-Loops™
Controle de Qualidade de Microrganismos

Controle de Qualidade - Cepas

Manutenção de estoque

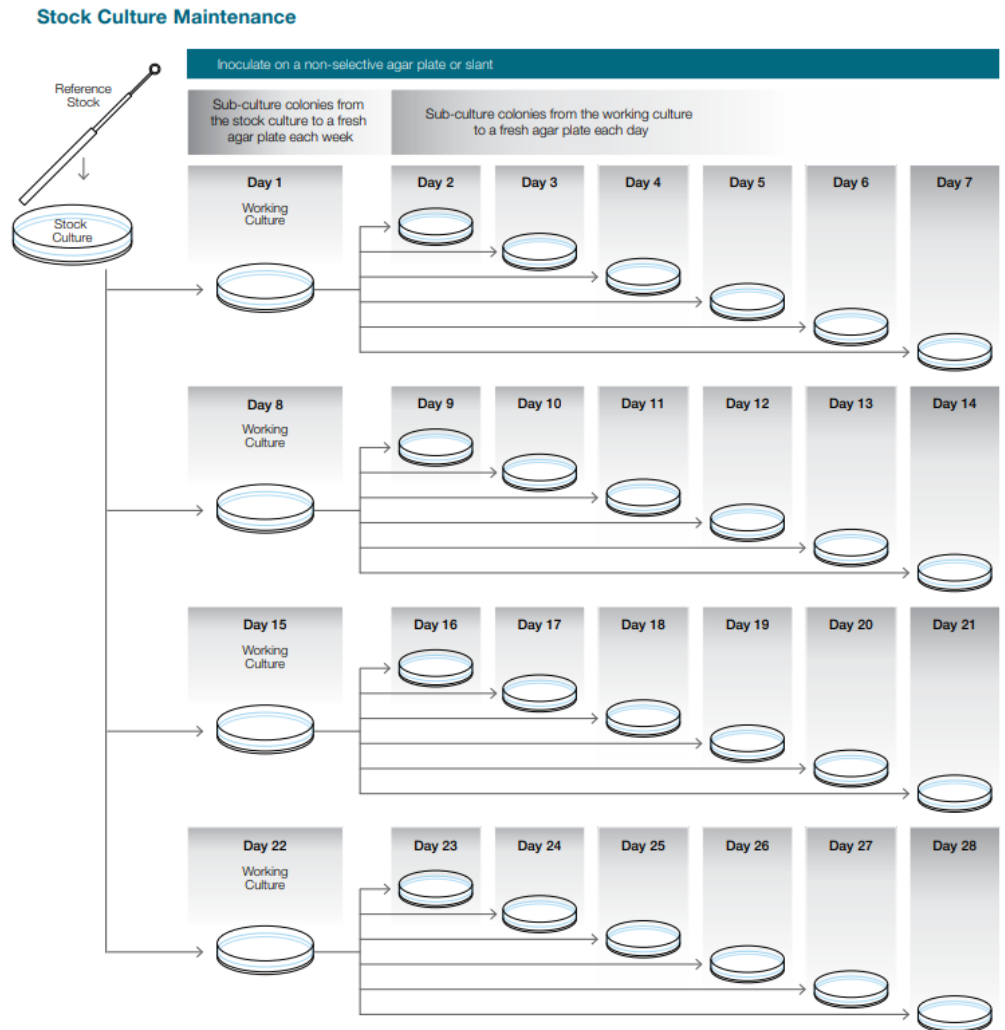
- Uma passagem = transferência de um organismo de uma cultura viável para um meio fresco
- A passagem excessiva deve ser evitada

Culturas de estoque congeladas:

- Importância das condições de armazenamento e manutenção adequadas
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento

Benefícios da Culti-Loops

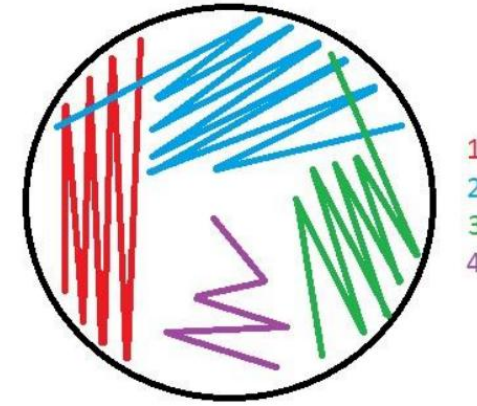
- Pronto para usar
- Não há necessidade de manter culturas congeladas – 1 loop/mês



Controle de Qualidade - Cepas

Manutenção de estoque

- O Material requer meio não-seletivos para otimizar o crescimento e a recuperação.
- Requer tempos e condições específicos de incubação para otimizar o crescimento e a recuperação:
 - Temperatura
 - Tempo de incubação
 - Atmosfera



- Como procedimento de (BPL) Boas Práticas Laboratoriais, identificar o microrganismo após a ativação do mesmo.
- Sempre utilizar microrganismos frescos para realização dos testes.
- Sempre selecione colônias isoladas para o seu teste.

Controle de Qualidade - Cepas

Risco de mutação:

- É preciso observar o que cada fabricante recomenda, seguir estas recomendações e manter a garantia do seu produto.
- Repiques mínimos reduz o risco de mutação. Cada transferência de um novo repique aumenta a probabilidade de mutações com indesejáveis chances de mudanças na característica, contaminação ou até mesmo morte do microorganismos.

Mutações ocorrem:

- Aleatoriamente;
- Frequentemente devido ao alto nível de replicações
- A ATCC recomenda que os repiques não podem ultrapassar a 5ª passagem, assim garantir a resposta padronizada das culturas.



Exemplo:

Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 9027™

- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 10145™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 13388™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 15442™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 19429™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 25619™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 27853™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 35032™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 35554™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 9027™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® 9721™
- Pseudomonas aeruginosa derived from ATCC® BAA-1744™
- Pseudomonas aeruginosa derived from NCIMB 12469
- Pseudomonas aeruginosa derived from NCIMB 8295
- Pseudomonas aeruginosa derived from NCIMB 8626
- Pseudomonas aeruginosa derived from NCTC 10662



E se mudar o gênero?

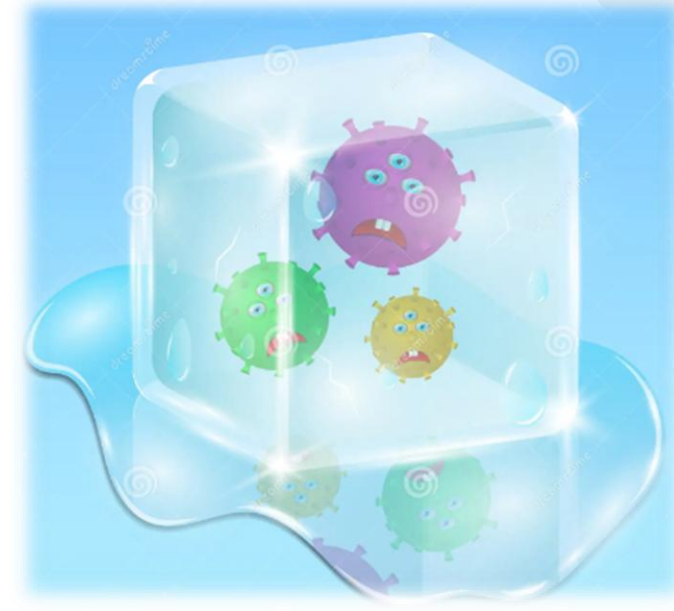
- *Pseudomonas brenneri* derived from ATCC® 49642™
- *Pseudomonas fluorescens* derived from ATCC® 13525™
- *Pseudomonas mosselii* derived from ATCC® 49838™
- *Pseudomonas protegens* (G) derived from ATCC® 17386™
- *Pseudomonas putida* derived from ATCC® 31483™
- *Pseudomonas putida* derived from ATCC® 49128™
- *Pseudomonas stutzeri* derived from ATCC® 17588™



Controle de Qualidade - Cepas

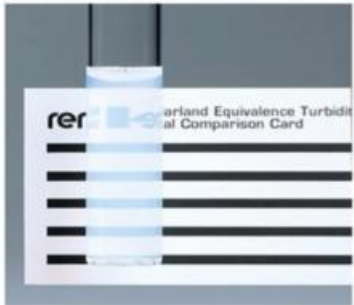
Congelamento de Cepa:

- É preciso observar o que cada fabricante recomenda, seguir estas recomendações e manter a garantia do seu produto.
 - Culturas congeladas contendo uma concentração final de 50% de glicerol como crioprotetor podem ser mantidas a -20°C para armazenamento de curto prazo (menos de um mês). Não armazene culturas congeladas em um freezer com ciclo de degelo; Isso exporá as culturas a temperaturas mais altas. As culturas liofilizadas/gel de matriz devem ser armazenadas a 2°C a 8°C . As inclinações podem ser mantidas entre 2°C e 8°C por até uma semana.
 - Criopreservação: em nitrogênio líquido (-196°C) ou ultrafreezer (-80°C).
 - Use crioprotetores tais como o glicerol ou o DMSO.
 - Taxa de congelamento controlada $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para limitar a formação de cristais de gelo.
 - Use frascos individuais.
 - Descongelar rápido (37°C) para limitar o stress osmótico.
 - **Não recongele!!**
-
- Como procedimento de (BPL) Boas Práticas Laboratoriais, identificar o microrganismo após à ativação do mesmo.



Pradronização do Inóculo

Escala MacFarland



Usa-se como padrão inicial de turbidez: tubos de escala MacFarland 0,5% (absorbância padrão) que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R20421?SID=srch-srp-R20421?query=macfarland#/R20421?SID=srch-srp-R20421%3Fquery>

Sensititre™ Nephelometer

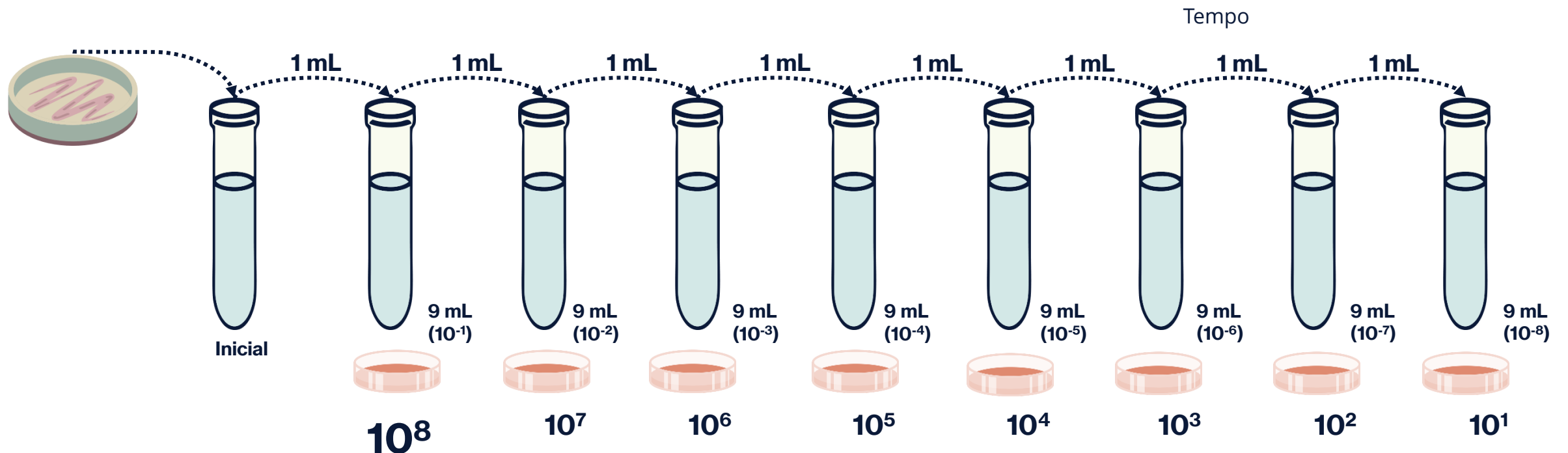


- Projetado para preparar rapidamente um inóculo consistente
- O LED de fácil leitura
- Luz indicadora oferece uma metodologia rápida para produzir suspensões Bacterianas equivalente ao padrão 0,5 MacFarland exigido.

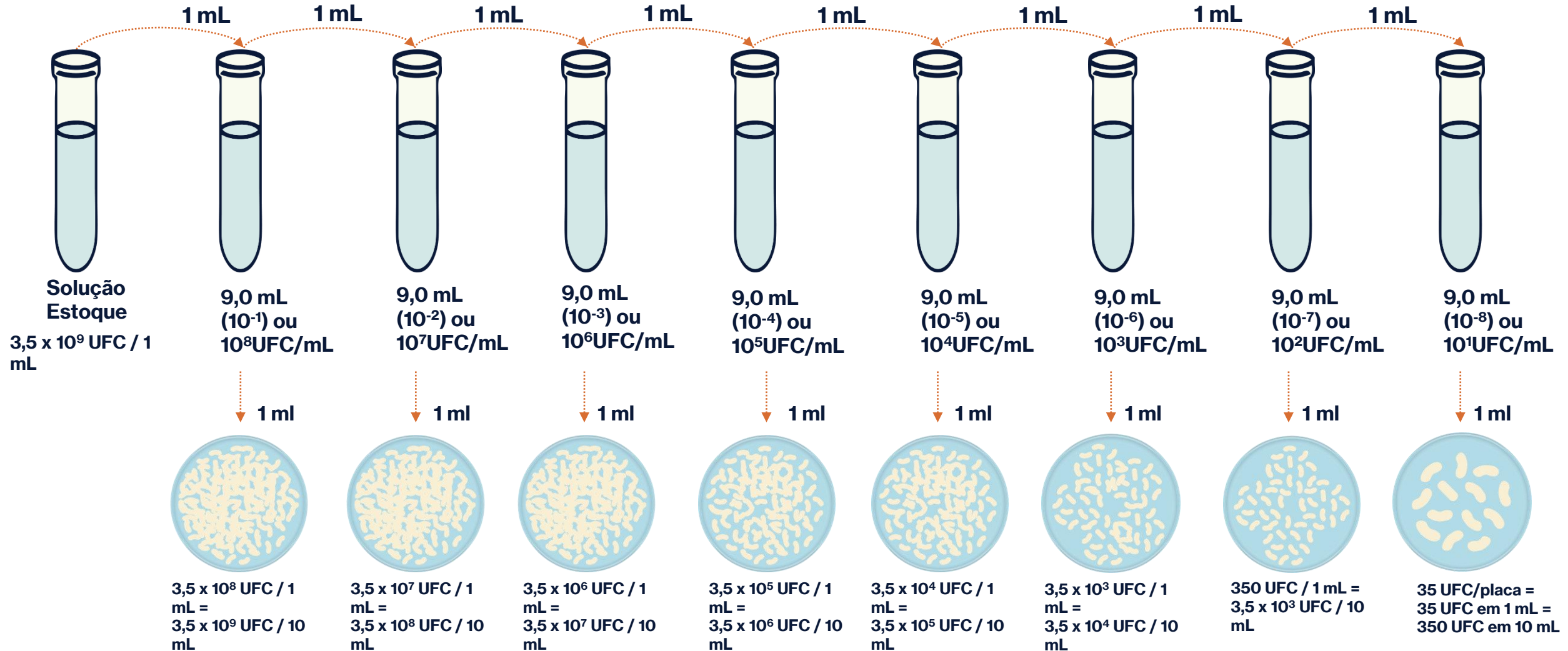
Pradronização do Inóculo

Diluição seriada:

- Diluição inicial (alçada carregada ou pouco carregada)
- Tipo do microorganismo



Diluição Seriada



Diluição Seriada

Posição	Fator	Conta (back-calc)	Concentração	Número inteiro
Placa	$\times 10 (\div 0,1 \text{ mL})$	35 UFC $\times 10$	$3,5 \times 10^2 \text{ UFC/mL}$	350
Tubo 8 (10^{-8})	$\times 10$	350×10	$3,5 \times 10^3 \text{ UFC/mL}$	3.500
Tubo 7 (10^{-7})	$\times 10$	3.500×10	$3,5 \times 10^4 \text{ UFC/mL}$	35.000
Tubo 6 (10^{-6})	$\times 10$	35.000×10	$3,5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$	350.000
Tubo 5 (10^{-5})	$\times 10$	350.000×10	$3,5 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$	3.500.000
Tubo 4 (10^{-4})	$\times 10$	$3.500.000 \times 10$	$3,5 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$	35.000.000
Tubo 3 (10^{-3})	$\times 10$	$35.000.000 \times 10$	$3,5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$	350.000.000
Tubo 2 (10^{-2})	$\times 10$	$350.000.000 \times 10$	$3,5 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$	3.500.000.000
Tubo 1 (10^{-1})	$\times 10$	3,5 bilhões $\times 10$	$3,5 \times 10^{10} \text{ UFC/mL}$	35.000.000.000
Estoque original	—	Concentração real da cultura	$3,5 \times 10^{10} \text{ UFC/mL}$	35 bilhões

A regra de ouro da diluição seriada

Cada vez que você pega 1 mL e coloca em 9 mL, a concentração é dividida por 10.

Então: $3,5 \times 10^8 \div 10 \div 10 \div 10 \div 10 \div 10 \div 10 \div 10 \div 10 = 3,5 \times 10^0 = 3,5 \text{ UFC/mL}$

Inoculando 0,1 mL na placa: $3,5 \times 0,1 = 0,35 \approx \text{arredondando} \rightarrow 35 \text{ UFC na placa}$ (se a concentração do tubo 8 fosse $3,5 \times 10^2$)

Pradronização do Inóculo

Espectrofotometria

- Preparo de curvas padrão para cada linhagem.
- Comprimento de onda 660nm (minimiza interferentes como cor do meio).





Temperatura de estocagem

- Indica-se armazenagem de bactérias aeróbias em temperaturas entre 2°- 8°C;
- Indica-se o armazenamento de cepas que requerem CO₂, à temperatura ambiente em jarras de anaerobiose com gerador;
- Leveduras e fungos devem ser armazenados em temperatura ambiente;
- Pode-se armazenar cepas anaeróbias e aeróbias à temperaturas entre 2°- 8°C;
- Duplicata.

Cepas Quantificadas



Thermo Scientific™ Quanti-Cult Plus™

- Sistema de dois frascos, sendo um contendo o organismo preservado em gel em uma tampa e o outro um fluido de hidratação
- Organismos derivados e licenciados da ATCC™
- Material Referência Acreditado ISO 17034
- Mais de 20 microrganismos (MR) disponíveis em linha



ATCC Licensed
Derivative



Thermo Scientific™ Quanti-Cult Plus™

Apresentação:

- 10 frascos com organismos preservados em gel (tampa vermelha)
 - Embalados individualmente
- 10 frascos com fluido de hidratação (tampa azul)

Nº de passagens:

- À partir da 2ª original ATCC



ATCC Licensed
Derivative



Thermo Scientific™ Quanti-Cult Plus™

1 Reidrate



2 Misture e incube por 15 minutos



3 Decante o inóculo



- Sistema em dois frascos:
 - Fácil de usar
 - Manipulação zero de microrganismo
 - Sem necessidade de repiques manuais
- Apresentação conveniente: <100 CFU por 0,1 mL
- Cada frasco fornece até 10 inóculos de 0,1ml
- Estabilidade por até 8 horas (armazenado sb refrigeração de 2° a 8°C)
- Redução de tempo de bancada: sem necessidade de um espectrofotômetro, turbidímetro ou inúmeras diluições seriadas
- Elimina longos períodos de crescimentos e manutenção de cepas

Dicas importantes

- Use placas secas
 - Use condições de crescimento corretas
 - Manter pipetas calibradas
 - Teste em duplicado ou triplicado
 - Testar em meio seletivo e não-seletivos
 - Testar um controle negativo
-



Material de Referência Certificado

Smart Note Thermo Fisher Scientific:

“O controle de qualidade é essencial para manter altos níveis de precisão e proficiência, independentemente das variações, como a mudança de métodos ou o aumento do tamanho das amostras, mas os laboratórios são tão bons quanto os produtos que utilizam.

A escolha de produtos de um fabricante credenciado pela ISSO 17034 garante a qualidade superior dos produtos de CQ e, por extensão, dos processos de CQ.”

The identity, purity, and authenticity of the Licensed Products are exclusively the responsibility of Remel Inc. and not ATCC.
The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative Word mark, and the ATCC Catalog Marks are trademarks of ATCC.
Remel Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® culture.



Thermo Fisher Scientific is accredited by A2LA as a registered reference material producer certificate number 6559.01 in accordance with ISO 17034[1].

[1] ISO 17034 First Edition 2016-11-01 General requirements for the competence of reference material producers



Accredited Reference Material Producer

A2LA has accredited

REMEL, INC., PART OF THERMO FISHER SCIENTIFIC *Lenexa, KS*

This accreditation covers the specific materials listed on the agreed upon Scope of Accreditation. This producer meets the requirements of *ISO 17034:2016 General Requirements for the Competence of Reference Material Producers*. This accreditation demonstrates technical competence for a defined scope and the operation of a quality management system.

Presented this 14th day of November 2022.



Vice President, Accreditation Services
For the Accreditation Council
Certificate Number 6559.01
Valid to August 31, 2024

For reference materials to which this accreditation applies, please refer to the reference material producer's Scope of Accreditation.

Challenge Test



Challenge Test

Objetivo

Verificar a eficácia do sistema conservante de produtos cosméticos e farmacêuticos garantindo sua segurança e qualidade ao longo da vida útil do produto.

Importância

- Garante a segurança do produto e do consumidor
- Validação do sistema conservante.
- Conformidade regulatória.
- Protege a marca.



Proteção Microbiana do Produto

A proteção do produto pode vir de várias fontes:

- Preservação química.
- Características inerentes à formulação.
- Design da embalagem.
- Processo de manufatura.



Etapas do Teste



Seleção microorganismos

- *E.coli*
- *P. aeruginosa*
- *S. aureus*
- *C. albicans*
- *A. brasiliensis*



Inoculação amostra

- $10^5 - 10^6$ bactérias
- $10^4 - 10^5$ - fungos e leveduras
- Individual ou pool



Monitoramento

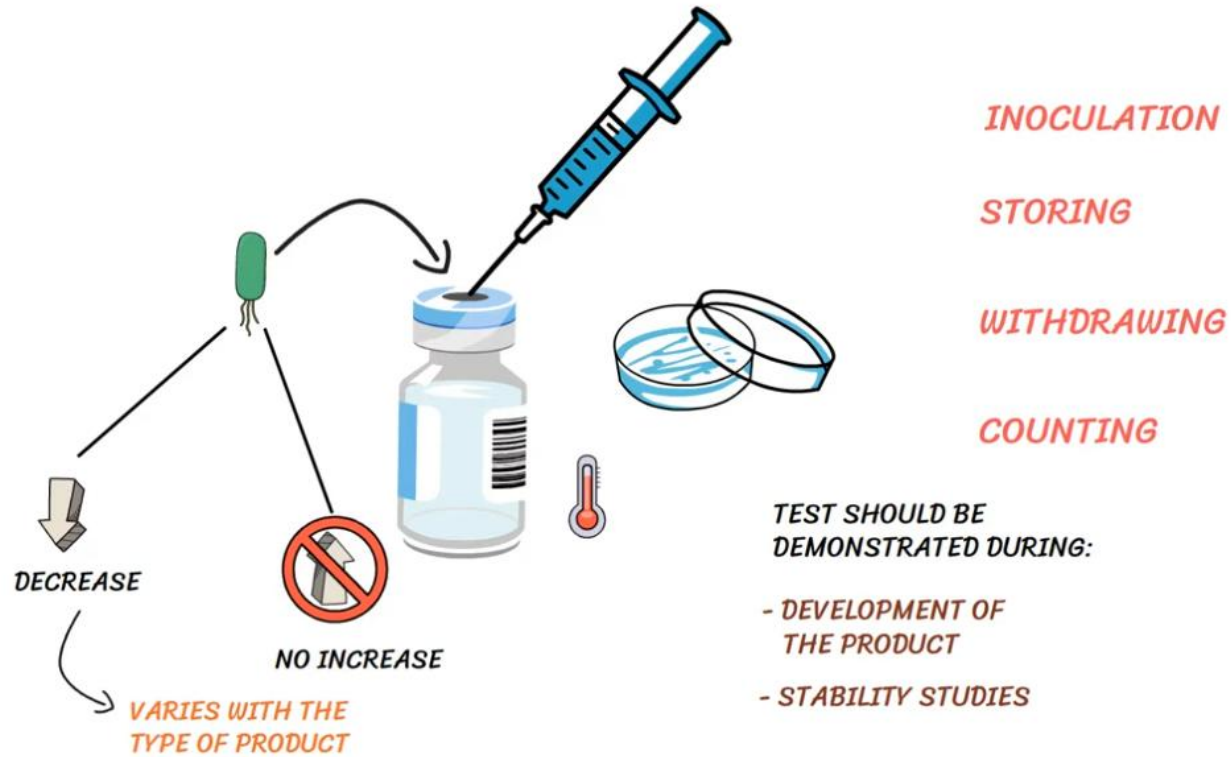
- Contagem em intervalos de tempo definidos
- 7, 14, 21 e 28 dias



Interperetação resultados

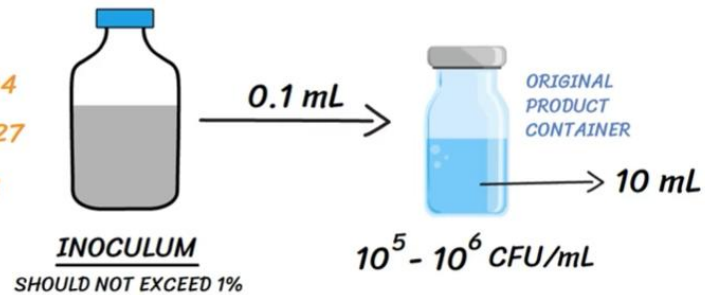
- ISO 11930
- USP <51>
- PCPC

Como o teste é conduzido?



Como o teste é conduzido?

Candida albicans ATCC 10231
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
Staphylococcus aureus ATCC 6538



- Seleção apropriada dos microrganismos (cepas ATCC) de acordo com a metodologia
- **Preparo do inóculo**
- **Inoculação**

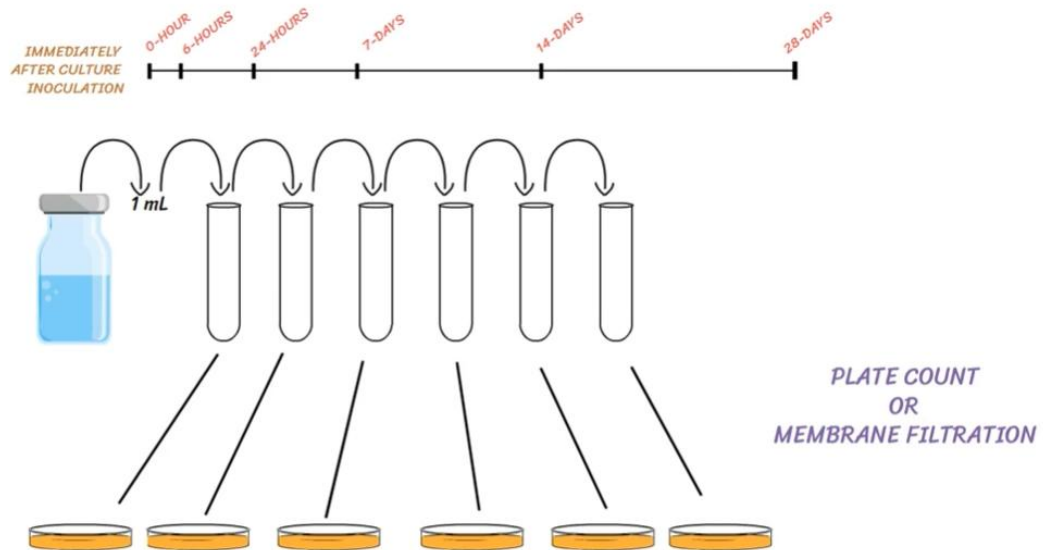


Como o teste é conduzido?



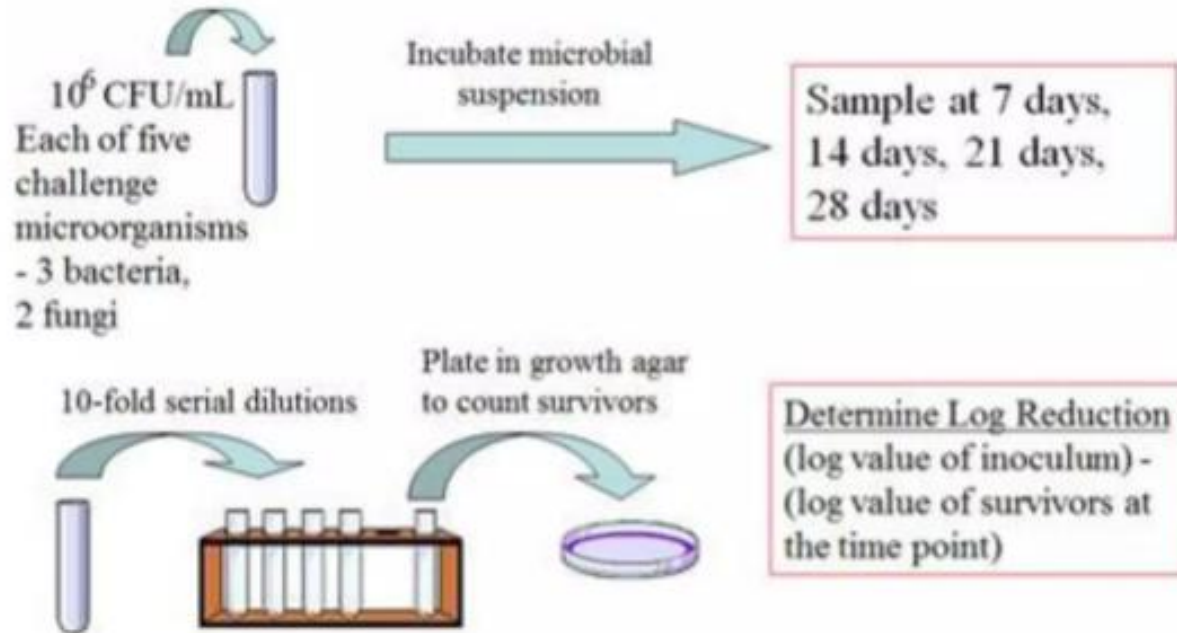
- Armazenar o produto em condições adequadas

Como o teste é conduzido?



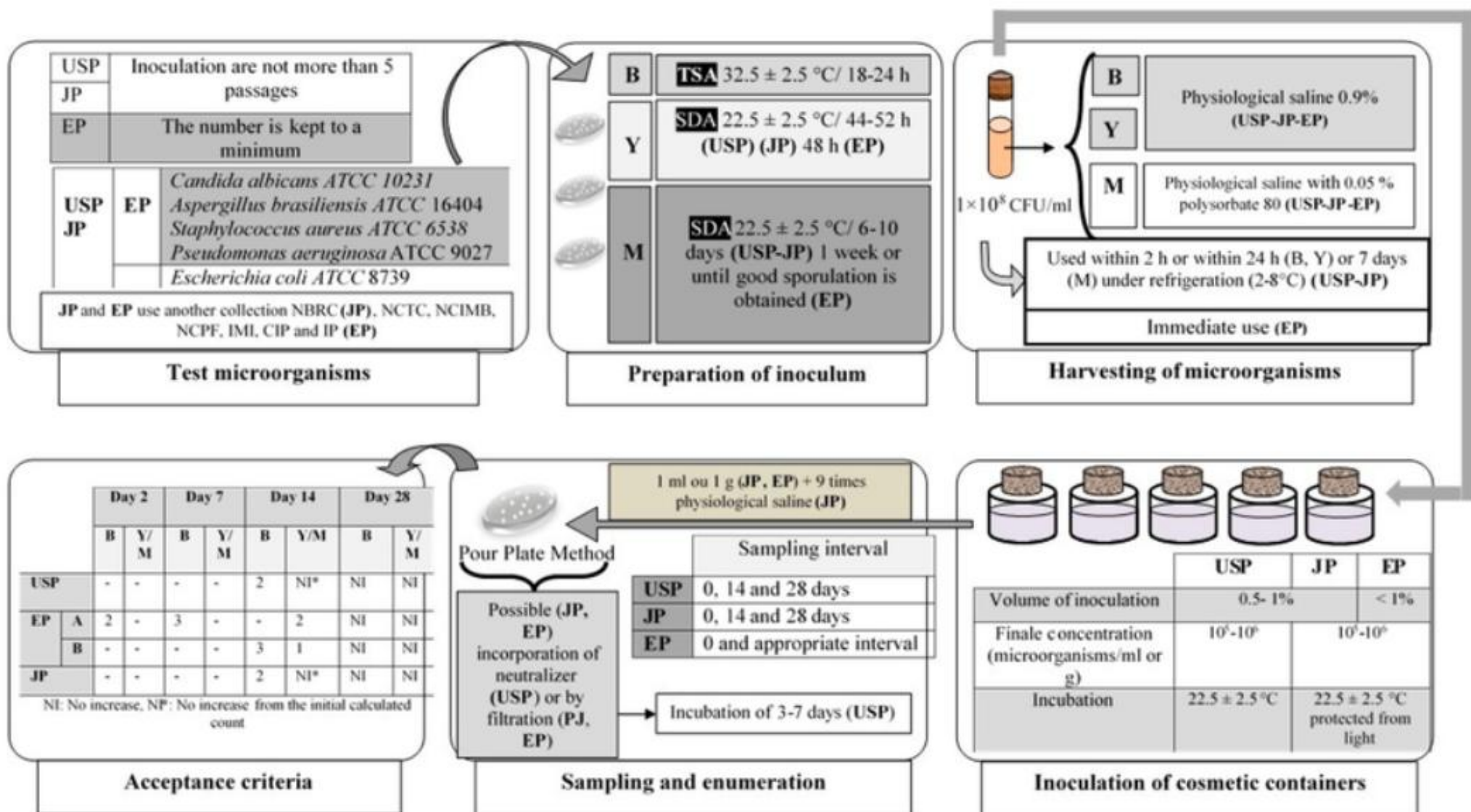
- Durante o período de teste, amostras são retiradas em intervalos regulares (0, 7, 14 e 28 dias) e submetidas à análise microbiológica

Como o teste é conduzido?



- Resultado: queda significativa do número de microrganismos introduzidos
- Demonstrar efetivamente a capacidade robusta do produto em “repelir” organismos patogênicos
- Critério de aceitação: varia de acordo com a metodologia adotada e o tipo de produto.

Resumo



Quando aplicar o Challenge Test?



**Alteração na
formulação,
embalagem e/ou
processo de
manufatura**



**Desenvolvimento
de novos produtos**



**Estudo
estabilidade e
shelf life**

Conclusão

A produção de produtos de baixo risco microbiológico é fundamental na indústria e, depende significativamente, da efetividade dos conservantes.

Ao mesmo tempo, o desenvolvimento de produtos com formulações mais naturais e menor uso de conservantes químicos apresenta novos desafios para a segurança microbiológica. Nesse contexto, challenge tests continuarão desempenhando um papel central na validação científica dessas formulações.

Para instituições de pesquisa, laboratórios analíticos e indústrias, investir em metodologias robustas de challenge test não representa apenas uma exigência regulatória, mas também uma estratégia essencial para garantir qualidade, segurança e confiança do consumidor em um mercado cada vez mais exigente.
