



RT N° IPEN-SECQR-2023-0002 Rev.00

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de processos de controle de qualidade de radiofármacos (CECRF)

Avaliação do bioindicador Sterikon[®] plus (Merck-Millipore) por filtração em membrana

Área emissora Serviço de Controle de Qualidade de Radiofármacos

Autor (es) Carlos Farias Felgueiras

Classificação de Segurança: distribuição interna

Março 2023



Equipe Técnica:

Carlos Farias Felgueiras (Tecnologista – SECQR)

Luan Júnior Santos (Iniciação Científica – SECQR)

Depositado em:

Repositório Institucional Digital – IPEN/SP

<http://repositorio.ipen.br>



RESUMO

O procedimento de esterilização por autoclavação deve ser monitorado pelo uso de indicadores biológicos (bioindicadores), em adição aos indicadores químicos e aos registros de temperatura e pressão da autoclave. A esterilização por calor úmido é o processo terminal que assegura a esterilidade tanto dos produtos GAL-IPEN e CARD-IPEN quanto da solução de molibdato de sódio-⁹⁹Mo, antes que esta seja adicionada às colunas de alumina na produção do GERADOR IPEN-TEC. O indicador biológico em uso no Centro de Radiofarmácia é o da marca Sterikon[®] plus, fabricado pela empresa Merck-Millipore. A rotina de utilização do referido bioindicador revelou frequente alteração da coloração do conteúdo da ampola, antes e após incubação a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 48 horas, o que prejudica a interpretação do teste e a liberação final dos lotes de radiofármacos estéreis. A fim de detectar microrganismos viáveis no bioindicador após incubação, sem tomar a coloração como referência, propomos neste trabalho a adoção da técnica de filtração em membrana. Também foi avaliada a possibilidade de realizar o ensaio após o decaimento dos radionuclídeos residuais nas ampolas, visando a minimizar o risco radiológico para o analista. Metodologia: (a) verificação do teste de filtração em membrana para detecção de *Geobacillus stearotherophilus* nas ampolas de bioindicador, frente a duas condições físico-químicas distintas do conteúdo das ampolas (adequação do teste); (b) estimativa da atividade radioativa residual média em ampolas de bioindicador, após incubação, submetidas à autoclavação nos processos produtivos de GERADOR IPEN-TEC, GAL-IPEN e CARD-IPEN; (c) cálculo do tempo para decaimento da atividade radioativa residual até os limites de isenção de cada radionuclídeo: Mo-99 (GERADOR IPEN-TEC), Tl-201 (CARD-IPEN) e Ga-67 (GAL-IPEN); seleção do maior intervalo de tempo como referência para os próximos testes com o bioindicador; (d) aplicação do teste de filtração em membrana com bioindicadores submetidos a três condições simuladas de autoclavação, em dois momentos (logo após incubação, e após o tempo de decaimento calculado). Principais resultados: (I) o teste qualitativo com filtração em membrana se mostrou adequado ao uso pretendido, com recuperação microbiana satisfatória em ambas as matrizes testadas; (II) o período estimado para decaimento até os limites de isenção foi de aproximadamente 31 dias, 16 dias e 13 dias para ampolas com Mo-99, Tl-201 e Ga-67, respectivamente; (III) os resultados dos testes qualitativos com ampolas logo após a incubação de 48 horas se



mostraram compatíveis com as três condições simuladas de autoclavação, o que não ocorreu com ampolas após o período de decaimento calculado. Conclusões e recomendações: o teste qualitativo de filtração em membrana para detecção de *G. stearothernophilus* nas ampolas do bioindicador Sterikon[®] plus é adequado para avaliar as ampolas autoclavadas e incubadas a (60 ± 1) °C por 48 horas, e que apresentem conteúdo com coloração variante antes e/ou após a incubação. Recomendamos medidas ordinárias de proteção radiológica na manipulação das ampolas, que usualmente portam traços de radionuclídeos com atividade inferior aos limites de dispensa conforme norma CNEN NN 8.01. A descrição da técnica para o teste qualitativo segue em Anexo ao trabalho.



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	06
2 DESENVOLVIMENTO	08
2.1 Metodologia	08
2.2 Procedimentos experimentais	09
2.2.1 Adequação do teste qualitativo com filtração em membrana	09
2.2.1.1 Descrição de material e equipamentos utilizados na adequação do teste qualitativo	11
2.2.2 Atividade radioativa residual em ampolas de bioindicador	12
2.2.3 Teste qualitativo aplicado aos bioindicadores	13
2.2.3.1 Descrição de material e equipamentos utilizados no teste qualitativo	15
2.3 Resultados e discussão	16
3 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	22
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
APÊNDICE A	25
APÊNDICE B	26
APÊNDICE C	28
ANEXO A1	29
ANEXO B1	31

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O Centro de Radiofarmácia do IPEN/CNEN produz ampla gama de radiofármacos, dentre os quais encontramos os radiofármacos prontos para o uso, os componentes não-radioativos para marcação com um componente radioativo, e os precursores radiofarmacêuticos – categoria que inclui os eluatos de geradores de radionuclídeos (ANVISA, 2022). Parte dos radiofármacos é produzida sob condições assépticas e com controle da qualidade microbiológica de matérias-primas e soluções intermediárias de processo, de forma a garantir a esterilidade do produto final.

A esterilização por calor úmido, ou autoclavação, é o processo terminal que assegura a esterilidade dos produtos GAL-IPEN (CNEN, 2015) e CARD-IPEN (CNEN, 2022). A autoclavação é também o processo de escolha para esterilização da solução de molibdato de sódio-⁹⁹Mo (CNEN, 2013), antes que aquela solução seja adicionada às colunas de alumina na produção do GERADOR IPEN-TEC. Para o monitoramento da esterilização por autoclavação, deve ser considerado o uso adicional de indicadores biológicos (ANVISA, 2019a), mais representativos da efetiva eliminação de microrganismos viáveis que os indicadores químicos e registros de temperatura e pressão da autoclave.

O indicador biológico em uso no Centro de Radiofarmácia é o da marca Sterikon[®] plus, fabricado pela empresa Merck-Millipore. O referido bioindicador consiste de uma ampola contendo caldo nutriente, açúcar, indicador de pH e esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. A resistência térmica dos esporos é tal que aqueles são completamente mortos após 15 minutos, quando aquecidos em vapor sob elevada pressão ($121 \pm 0,5$ °C a 245 kPa). Quando temperaturas mais baixas ou menores tempos de autoclavação são empregados, pequeno número de esporos sobrevive e prolifera no caldo nutriente. Dessa forma, se o processo de esterilização estiver adequado, os esporos de *G. stearothermophilus* são mortos e o conteúdo da ampola permanece com a coloração de vermelha-clara a vermelha-violácea, após incubação a 60 ± 2 °C por 48 horas. Na ocorrência de esterilização inadequada, alguns esporos sobrevivem, e a coloração do conteúdo da ampola tende de amarelada a amarelada-alaranjada dentro de 24 horas, em função da formação de ácido a partir da fermentação dos açúcares presentes no caldo nutriente (MERCK-MILLIPORE, 2023).

No ano de 2020, foi registrado o desvio de qualidade RNC-SETOR-1641-2020 no sistema de Tratamento de Não-Conformidades e Melhoria Contínua do Centro de Radiofarmácia. O registro se deveu à detecção de ampolas de bioindicador com o conteúdo amarelo-alaranjado logo após a autoclavação de solução com molibdato de sódio-⁹⁹Mo, utilizada na produção de três lotes do GERADOR IPEN-TEC. A coloração amarela-alaranjada é similar à obtida quando da ocorrência de esterilização ineficaz, após incubação a 60 ± 1 °C por 48 horas conforme procedimento interno (CNEN, 2023). Por esse motivo, não seria possível confirmar a eficácia da esterilização quando fossem geradas ampolas de coloração distinta de vermelha-clara a vermelha-violácea. Na prática, o teste com indicadores biológicos resultaria inválido, o que contraria as normativas sanitárias relacionadas à produção de medicamentos estéreis (ANVISA, 2019a).

Em decorrência do observado no RNC-SETOR-1641-2020, a coloração das ampolas de bioindicador passou a ser verificada e registrada antes e depois da etapa de incubação a 60 ± 1 °C. Ao longo do período de Março a Setembro de 2021, por exemplo, observamos dezessete ampolas com coloração pré-incubação alterada (variando entre incolor, rósea, amarronzada e amarelada), em contraste com as colorações vermelha-clara a vermelha-violácea esperadas. No mesmo período, quarenta e duas ampolas apresentaram coloração pós-incubação distinta dos padrões de esterilização eficaz (vermelha-clara a vermelha-violácea) e ineficaz (amarelada a amarelada-alaranjada), variando entre incolor, rósea e amarronzada. O problema se concentrou nas produções de GERADOR IPEN-TEC, porém abrangeu a esterilização de outros produtos e materiais, tais como soluções de produção, vidrarias, GAL-IPEN e CARD-IPEN.

A causa da alteração na coloração do conteúdo dos bioindicadores ainda é desconhecida. A princípio, podemos atribuí-la aos efeitos da radiação ionizante (exposição das ampolas às fontes radioativas durante a autoclavação), à temperatura da câmara interna da autoclave estar eventualmente fora do intervalo de qualificação (o indicador pode ser danificado em temperatura superior a 125 °C) (MERCK-MILLIPORE, 2023), ou a ambos os efeitos simultaneamente, de forma complementar ou sinérgica. Estudos para investigação da causa seguem em curso; todavia, é premente o desenvolvimento de técnica que possibilite a detecção de microrganismos viáveis no conteúdo do bioindicador após incubação, sem tomar a coloração como referência. A presença ou ausência de *G. stearothermophilus* viáveis

denotam processo de esterilização ineficaz ou eficaz, respectivamente, resultado fundamental para liberação final de um lote de radiofármaco estéril.

Neste trabalho, propomos a técnica de filtração em membrana para detecção de bactérias viáveis de *G. stearothermophilus* em bioindicador após incubação a 60 ± 1 °C por 48 horas. A aplicação da técnica implica, nas situações de rotina, a manipulação de ampolas contaminadas externamente com radionuclídeos oriundos do processo produtivo. Visando a minimizar o risco radiológico a que se submeteria o técnico analista no Laboratório Microbiológico do Serviço de Controle de Qualidade de Radiofármacos (SECQR), quando da manipulação das ampolas, investigamos também a possibilidade de realizar o ensaio após o decaimento radioativo dos radionuclídeos residuais nas ampolas.

Os objetivos deste trabalho são: desenvolver método qualitativo para detecção de *G. stearothermophilus*; propor uma descrição detalhada da técnica, a ser validada e utilizada em rotina pelo SECQR.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Metodologia

a) Verificação do teste de filtração em membrana para detecção de *G. stearothermophilus* nas ampolas de bioindicador, frente a duas condições físico-químicas distintas do conteúdo das ampolas (adequação do teste);

b) Estimativa da atividade radioativa residual média em ampolas de bioindicador, após incubação, submetidas à autoclavação nos processos produtivos de GERADOR IPEN-TEC, GAL-IPEN e CARD-IPEN;

b) Cálculo do tempo para decaimento da atividade radioativa residual até os limites de isenção de cada radionuclídeo: Mo-99 (GERADOR IPEN-TEC); Tl-201 (CARD-IPEN); Ga-67 (GAL-IPEN). Seleção do maior intervalo de tempo como referência para os próximos testes com o bioindicador;

d) Aplicação do teste de filtração em membrana com bioindicadores submetidos a três condições simuladas de autoclavação, em dois momentos (logo após incubação, e após o tempo de decaimento calculado).

2.2 Procedimentos experimentais

2.2.1 Adequação do teste qualitativo com filtração em membrana

O teste proposto está descrito no ANEXO A1. A adequação do teste foi executada com duas matrizes analíticas: MATRIZ 1, representando bioindicador submetido a esterilização eficaz (coloração vermelha-clara a vermelha-violácea após incubação); MATRIZ 2, característica de bioindicador esterilizado em processo ineficaz (coloração amarelada a amarelada-alaranjada após incubação). As etapas paralelas à adequação do teste estão descritas a seguir:

(a) Técnica de filtração em membrana do conteúdo das ampolas de bioindicador – O copo da unidade filtrante foi preenchido com cerca de 80 mL do Fluido de Rinsagem; a ampola em análise foi envolvida com gaze embebida em álcool isopropílico 70%, e aberta com lima triangular afilada, executando um sulco no gargalo da ampola e removendo a parte superior daquela; o conteúdo da ampola foi transferido para o Fluido de Rinsagem A, com técnica asséptica; o copo da unidade filtrante foi completado até 100 mL com o Fluido; a bomba foi acionada para a filtração; após a filtração, a peça da unidade filtrante com a membrana foi acoplada à placa com meio de cultura Ágar Soja-Trypticase (TSA 60 mm), de forma à membrana permanecer em contato com o meio; a placa fechada foi incubada a (60 ± 1) °C por 48 horas. Após incubação, as colônias bacterianas foram contadas manualmente, com inspeção das duas faces da membrana filtrante.

(b) Preparo da MATRIZ 1 – Três ampolas do bioindicador Sterikon® Plus (lote Z0768474, validade 16/09/2023) foram retiradas da geladeira cerca de 30 minutos antes do ensaio, para que alcançassem a temperatura ambiente no momento daquele. Duas das ampolas foram submetidas à autoclavação a 121 °C por 20 minutos, seguida de secagem (aproximadamente 80 °C) por 30 minutos (processo 0011/23). O conteúdo das ampolas permaneceu violáceo após a autoclavação.

(c) Preparo da suspensão de *G. stearothermophilus* para a adequação com MATRIZ 1 - A ampola remanescente do preparo de MATRIZ 1 (carga microbiana de $1,4 \times 10^6$ UFC [Unidade Formadora de Colônia], conforme o certificado de análise do bioindicador apresentado no ANEXO B1) foi aberta e seu conteúdo integral foi transferido para microtubo de 2 mL, e centrifugado a 43.100 g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado (botão celular não visualizado), e foram adicionados ao microtubo 2 mL de de NaCl 0,9%

estéril. Após agitação mecânica por um minuto, a suspensão foi submetida à diluição seriada em NaCl 0,9% estéril, nas diluições 1:10 e 1:100 (100 µL diluição anterior + 900 µL de salina). A diluição 1:100 corresponde à concentração 7×10^3 UFC.mL⁻¹, e foi tomada como a suspensão de trabalho (140 UFC em 20 µL). A suspensão foi mantida em geladeira até o momento da contaminação da ampola MATRIZ 1 teste.

(d) Preparo da MATRIZ 2 – Três ampolas do bioindicador Sterikon[®] Plus (lote Z0716774, validade 15/01/2023) foram retiradas da geladeira e permaneceram à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos, após o que foram incubadas a (60 ± 1) °C por 48 horas. Depois da incubação, as ampolas foram autoclavadas a 121 °C por 20 minutos, seguido de secagem (aproximadamente 80 °C) por 30 minutos (processo 0006/23). O conteúdo das ampolas passou de violáceo a amarelado (ligeiramente turvo) após incubação, em função da proliferação de microrganismos e consequente redução do pH. A autoclavação não modificou a coloração verificada após a incubação.

(e) Preparo da suspensão de *G. stearothermophilus* para a adequação com MATRIZ 2 – Similar ao descrito anteriormente para MATRIZ 1. A ampola remanescente do preparo de MATRIZ 2 apresentava carga microbiana de $5,3 \times 10^5$ UFC, conforme o certificado de análise do bioindicador apresentado no ANEXO B1. A diluição 1:100 corresponde à concentração $2,65 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹, e foi tomada como a suspensão de trabalho (53 UFC em 20 µL).

Adequação do teste qualitativo com filtração em membrana – As duplicatas de ampolas MATRIZ 1 e MATRIZ 2 preparadas foram abertas com técnica asséptica, e a uma das ampolas da duplicata foram acrescentados 20 µL de NaCl 0,9% estéril (MATRIZ 1 controle negativo / MATRIZ 2 controle negativo). À outra ampola (MATRIZ 1 teste / MATRIZ 2 teste) foram acrescentados 20 µL da suspensão de *G. stearothermophilus* com aproximadamente 100 UFC. O volume do inóculo corresponde a 1% do volume total do conteúdo da ampola. O conteúdo integral das ampolas foi submetido à técnica de filtração em membrana, conforme descrito anteriormente.

No momento da contaminação de MATRIZ 1 teste / MATRIZ 2 teste, realizamos controle quantitativo da suspensão microbiana, com aplicação de 20 µL da suspensão sobre 80 µL de salina estéril, em duplicata de placas Ágar Soja-Trypticase (TSA), e dispersão com alça de Drigalsky estéril. As placas foram incubadas a (60 ± 1) °C em câmara úmida, pelo

período de 48 horas. A média de contagens da duplicata será tomada como 100% no cálculo da recuperação de microrganismos em MATRIZ 1 teste ou MATRIZ 2 teste.

2.2.1.1 Descrição de material e equipamentos utilizados na adequação do teste qualitativo

Lima agulha, do tipo triangular afilada (comprimento total com cabo – 150 mm; marca Vonder);

Micropipeta 20 – 200 µL (Eppendorf) – CR 1739;

Ponteira estéril 250 µL (VistaLab) – lote 21319S, validade 31/12/2023;

Fluxo unidirecional – CR 0232;

Estufa (60 ± 1) °C (Panasonic) – CR 1685;

Micropipeta 100 – 1.000 µL (Eppendorf) – CR1128;

Ponteira 1.250 µL (VistaLab) – lote 19364S, validade 31/01/2023;

TSA 60 mm (Merck-Millipore) – lote F2BB93377, validade 07/02/2023;

Unidade filtrante (Merck-Millipore) – lote F0HB63256C, validade 30/06/2023;

Bomba Milliflex – CR1739;

Fluido de Rinsagem A – lote F2DB63624, validade 30/04/2023;

Centrífuga Mikro 220R (Hettich) – CR1865;

Solução fisiológica estéril (NaCl 0,9% Hypofarma – lote 21040811, validade 30/04/2023;

Autoclave modelo 2540 EKA-P (Tuttnauer) – CR 2278;

TSA 90mm (PlastLabor) – lote MIN2212402, validade 25/02/2023;

Alça de Drigalsky estéril (Olen) – lote 200426, validade 26/04/2023;

Agitador mecânico IKA Vortex Genius 3 – CR1494.

2.2.2 Atividade radioativa residual em ampolas de bioindicador

O histórico de autoclavagem dos materiais contendo radionuclídeos (por exemplo, Mo-99, Ga-67 ou Tl-201) evidencia que os bioindicadores introduzidos nos processos são contaminados por aqueles radionuclídeos. Por consequência, a abertura das ampolas de bioindicador, proposta em várias etapas deste trabalho, representa risco de contaminação radioativa tanto do operador quanto do ambiente de trabalho, no Laboratório Microbiológico.

Para reduzir o risco radiológico da manipulação, propusemos que a abertura ocorra após o decaimento da radioatividade residual nas ampolas, condição testada conforme descrito no item 2.2.3. Para fins de cálculo, consideramos como decaídas as amostras que atinjam os níveis de dispensa para materiais sólidos contendo radionuclídeos, estabelecidos na norma *Gerência de Rejeitos Radioativos de Baixo e Médio Níveis de Radiação* (CNEN, 2014). Assim, para cada radionuclídeo considerado neste trabalho, temos os seguintes níveis de dispensa:

- Mo-99: concentração de atividade 1×10^2 kBq/kg; atividade 1×10^6 Bq;
- Ga-67: concentração de atividade 1×10^2 kBq/kg; atividade 1×10^6 Bq;
- Tl-201: concentração de atividade 1×10^2 kBq/kg; atividade 1×10^6 Bq.

O primeiro passo no cálculo do tempo de decaimento foi a estimativa da massa média de uma ampola de bioindicador. Realizamos a pesagem individual de vinte ampolas do bioindicador Sterikon[®] Plus (lote Z0716774, validade 15/01/2023), utilizando a balança semi-analítica modelo BL320H (Shimadzu – CR1920). As ampolas foram retiradas da geladeira cerca de 30 minutos antes da pesagem, para que alcançassem a temperatura ambiente durante a medição. O valor da média aritmética das massas foi utilizado no cálculo da concentração de atividade ao término da incubação das ampolas.

O segundo passo foi estimar a atividade radioativa das ampolas de bioindicador ao término do período de incubação a (60 ± 1) °C. Ampolas oriundas dos processos produtivos de GERADOR IPEN-TEC, GAL-IPEN e CARD-IPEN foram coletadas ao longo de seis meses, e tiveram suas atividades radioativas determinadas por espectrometria gama no sistema Canberra. O sistema consiste em: detector de germânio de alta resolução (GX1518 - CR1423); blindagem com chumbo, cobre e zinco; processador de sinal digital Lynx; programa Genie 2000, para levantamento e análise do espectro gama. A calibração de energia

foi realizada com fontes de Cs-137 e Co-60, e a calibração de eficiência com fonte multielementar compreendendo a região 46 – 1332 keV. As ampolas foram posicionadas à distância fixa de 16,8 cm da janela do detector, durante as medições.

O cálculo da atividade radioativa logo após a incubação (A_0) segue a expressão:

$$A_0 = \frac{A}{e^{[-(\ln 2)\Delta t]/T}} \quad (1)$$

Onde A representa a atividade radioativa medida por espectrometria gama, Δt o intervalo de tempo decorrido entre o término da incubação e a medida da atividade, e T a meia-vida física do radionuclídeo (65,94 h para Mo-99; 3,2612 dias para Ga-67; 72,912 h para Tl-201) (CHU *et al.*, 1999).

A atividade radioativa residual ao término da incubação foi estimada pela soma da média aritmética com três desvios-padrão, referentes ao conjunto de atividades A_0 para cada radionuclídeo. A estimativa, conservadora, oferece o “pior caso” para o teste microbiológico com o bioindicador – ou seja, a maior atividade radioativa residual que poderia ser obtida com um dado radionuclídeo, e que demanda tempo de decaimento mais prolongado.

2.2.3 Teste qualitativo aplicado aos bioindicadores

A esterilização por autoclavação altera a carga microbiana presente nos bioindicadores, com três resultados possíveis: manutenção ou redução da carga microbiana (esterilização ineficaz); eliminação da carga microbiana (esterilização eficaz). Por sua vez, há duas possibilidades para o momento de teste com os bioindicadores: logo após a incubação, e após decaimento da atividade radioativa residual. A combinação das variáveis de carga microbiana e do momento do teste qualitativo resulta em seis situações, simuladas conforme descrito a seguir:

(a) Carga elevada, sem decaimento - Uma ampola do bioindicador Sterikon[®] Plus (lote Z0716774, validade 15/01/2023) foi retirada da geladeira e permaneceu por cerca de 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a ampola foi incubada a $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 48 horas. O conteúdo integral da ampola foi submetido à técnica de filtração em membrana, conforme descrito no item 2.2.1. A placa foi incubada a $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 48 horas;

(b) Carga elevada, com decaimento - Uma ampola do bioindicador Sterikon[®] Plus (lote Z0716774, validade 15/01/2023) foi retirada da geladeira e permaneceu por cerca de

60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a ampola foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 36 dias (48 horas de incubação rotineira, acrescidas de 34 dias para simulação do decaimento). O conteúdo integral da ampola foi submetido à técnica de filtração em membrana, conforme descrito no item 2.2.1. A placa foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 48 horas;

(c) Carga eliminada, sem decaimento - Uma ampola do bioindicador Sterikon[®] Plus (lote Z0716774, validade 15/01/2023) foi retirada da geladeira e permaneceu por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a ampola foi autoclavada a $121 ^\circ\text{C}$ por 20 minutos, com período de secagem (aproximadamente $80 ^\circ\text{C}$) por 30 minutos (processo 0161/22). Na sequência, a ampola foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 48 horas. O conteúdo integral da ampola foi submetido à técnica de filtração em membrana, conforme descrito no item 2.2.1. A placa foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 48 horas;

(d) Carga eliminada, com decaimento - Uma ampola do bioindicador Sterikon[®] Plus (lote Z0716774, validade 15/01/2023) foi retirada da geladeira e permaneceu por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a ampola foi autoclavada a $121 ^\circ\text{C}$ por 20 minutos, com período de secagem (aproximadamente $80 ^\circ\text{C}$) por 30 minutos (processo 0161/22). Na sequência, a ampola foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 36 dias (48 horas de incubação rotineira, acrescidas de 34 dias para simulação do decaimento). O conteúdo integral da ampola foi submetido à técnica de filtração em membrana, conforme descrito no item 2.2.1. A placa foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 48 horas.

(e) Carga reduzida, sem decaimento - Uma ampola do bioindicador Sterikon[®] Plus (lote Z0716774, validade 15/01/2023) foi retirada da geladeira e permaneceu por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a ampola foi autoclavada a $121 ^\circ\text{C}$ por 04 minutos, sem período de secagem (processo 0160/22). Na sequência, a ampola foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 48 horas. O conteúdo integral da ampola foi submetido à técnica de filtração em membrana, conforme descrito no item 2.2.1. A placa foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 48 horas;

(f) Carga reduzida, com decaimento – Uma ampola do bioindicador Sterikon[®] Plus (lote Z0716774, validade 15/01/2023) foi retirada da geladeira e permaneceu por cerca de 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a ampola foi autoclavada a $121 ^\circ\text{C}$ por 04 minutos, sem período de secagem (processo 0160/22). Na sequência, a ampola foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 36 dias (48 horas de incubação rotineira, acrescidas de 34 dias

para simulação do decaimento). O conteúdo integral da ampola foi submetido à técnica de filtração em membrana, conforme descrito no item 2.2.1. A placa foi incubada a $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ por 48 horas;

Testes preliminares com autoclavação a $121 ^\circ\text{C}$ por 06, 04 e 03 minutos (dados não mostrados neste trabalho) indicaram que seis minutos de autoclavação implica eliminação total da carga microbiana, em oposição às informações do fabricante do bioindicador (esterilização a $121 \pm 0,5 ^\circ\text{C}$ por seis minutos implica que toda ampola contenha esporos viáveis) (MERCK-MILLIPORE, 2023). Por sua vez, os tempos de 04 e 03 minutos proporcionaram redução significativa da carga microbiana, de $5,0 \times 10^5 - 1,0 \times 10^7$ para menos do que 100 esporos viáveis por ampola. Ademais, a Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019b) preconiza 100 UFC como carga microbiana limite nos testes de promoção de crescimento dos meios de cultura, indicando que carga inferior a 100 UFC pode ser considerada suficientemente pequena para desafiar meios de nutritivos. Por esses motivos, optamos pelo tempo de 04 minutos como referência nos testes de carga reduzida.

2.2.3.1 Descrição de material e equipamentos utilizados no teste qualitativo

Lima agulha, do tipo triangular afilada (comprimento total com cabo – 150 mm; marca Vonder);

Micropipeta 20 – 200 μL (Eppendorf) – CR 1739;

Ponteira estéril 250 μL (VistaLab) – lote 21319S, validade 31/12/2023;

Fluxo unidirecional – CR 0232;

Estufa $(60 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (Panasonic) – CR 1685;

TSA 60 mm (Merck-Millipore) – lote F2BB93377, validade 07/02/2023;

Unidade filtrante (Merck-Millipore) – lote F0HB63256C, validade 30/06/2023;

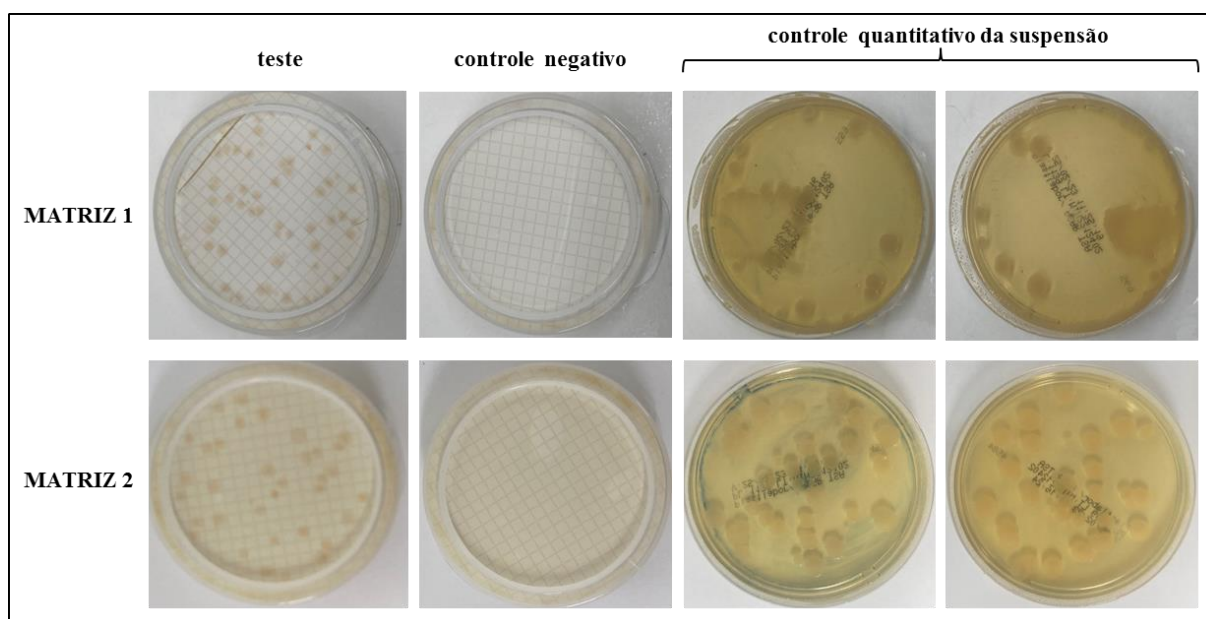
Bomba Milliflex – CR1739;

Fluido de Rinsagem A – lotes F2BB89015, validade 28/02/2023, e F2BB93377, validade 07/02/2023.

2.3 Resultados e discussão

A partir dos dados apresentados na FIGURA 1, foram calculados os percentuais de recuperação microbiana do *G. stearothermophilus* nas duas matrizes testadas, assumindo-se como 100% a média de contagens na duplicata de placas do controle quantitativo da suspensão microbiana. Para MATRIZ 1 (bioindicador submetido a esterilização eficaz), a recuperação foi de 236,4%, e para MATRIZ 2 (bioindicador submetido a esterilização ineficaz) atingiu 105,6%; portanto, a recuperação se mostrou satisfatória (maior ou igual a 50%) em ambas as matrizes, denotando que o teste qualitativo com filtração em membrana é adequado para o uso pretendido. Nos testes com a MATRIZ 2, observamos que a membrana filtrante assume coloração amarelada, o que pode ser atribuído ao resíduo do indicador químico em pH reduzido, típico do meio após proliferação de microrganismos. A alteração na coloração, todavia, não compromete a visualização e a contagem das colônias bacterianas.

FIGURA 1 – Resultados da adequação do teste qualitativo com filtração em membrana. As placas “MATRIZ 1 teste” e “MATRIZ 2 teste” apresentaram, respectivamente, 65 UFC e 38 UFC. Nas placas de controle negativo não houve proliferação da bactéria *Geobacillus stearothermophilus*. Resultados do controle quantitativo da suspensão com *G. stearothermophilus*: 22 UFC e 33 UFC (média de 27,5 UFC) no teste de MATRIZ 1; 33 UFC e 39 UFC (média de 36 UFC) no teste de MATRIZ 2.



A massa média da ampola de bioindicador Sterikon[®] Plus foi de 3,917 g (vinte ampolas pesadas individualmente). Com esse valor, foi calculada a concentração de atividade ao término da incubação das ampolas, para cada um dos radionuclídeos (TABELAS 1 a 3).

A análise dos dados apresentados nos APÊNDICES A e B indica que a atividade ao término da incubação das ampolas, para os radionuclídeos Tl-201 e Ga-67, foi superestimada em várias das amostras. Nesses casos, as circunstâncias particulares de segregação e medição da radioatividade das amostras acarretaram longo intervalo de tempo entre as duas etapas, superior a dez meias-vidas físicas dos radionuclídeos (cerca de 31 dias para Tl-201 e 33 dias para Ga-67). Esse fato origina a não-detecção dos radionuclídeos e acentua a inadequação da Atividade Mínima Detectável como preditora da atividade corrigida pelo decaimento. Para eliminar o viés de medição, foram excluídas do cálculo de atividade as amostras medidas após intervalo superior a dez meias-vidas físicas do término de incubação, o que resultou nos dados apresentados nas TABELAS 2 e 3.

TABELA 1 – Estimativa da atividade radioativa residual (em termos de Molibdênio-99) em ampolas de bioindicador, amostradas do processo produtivo do GERADOR IPEN-TEC

Lote de GERADOR IPEN-TEC*	Data - início da incubação	Data - término da incubação	Medição da atividade		Atividade - término da incubação (Bq)**	Concentração de atividade - término da incubação (kBq/kg)***
			Data/horário	Atividade (kBq)		
230-C	25/07/22	27/07/22	28/7/22 16:52	1,135331E+02	1,537394E+05	3,924927E+04
			28/7/22 17:07	7,786355E+01		
230-?	23/07/22	25/07/22	28/7/22 17:48	1,573663E+02	3,562560E+05	9,095125E+04
			28/7/22 18:02	3,031824E+02		
231-E	29/07/22	31/07/22	2/8/22 17:14	9,199012E+01	1,608947E+05	4,107599E+04
			2/8/22 17:28	4,717479E+01		
231-I	29/07/22	31/07/22	2/8/22 17:54	1,245570E+02	2,193862E+05	5,600873E+04
			2/8/22 18:07	1,996248E+02		

TABELA 1 (continuação)

231-C	30/07/22	01/08/22	2/8/22 18:20	2,058461E+01	2,830706E+04	7,226720E+03
			2/8/22 18:34	1,004749E+02	1,385077E+05	3,536067E+04
232-C	05/08/22	07/08/22	16/8/22 16:59	8,020692E+00	8,168272E+04	2,085339E+04
			16/8/22 17:13	4,195859E+01	4,283546E+05	1,093578E+05
232-E	05/08/22	07/08/22	16/8/22 17:27	6,978639E+01	7,141963E+05	1,823325E+05
			16/8/22 17:39	5,288021E+01	5,423158E+05	1,384518E+05
232-G	04/08/22	06/08/22	16/8/22 17:53	2,344065E+01	3,517152E+05	8,979198E+04
			16/8/22 18:05	1,372439E+00	2,063606E+04	5,268332E+03
232-I	05/08/22	07/08/22	16/8/22 18:19	7,414828E-01	7,657744E+03	1,955002E+03
			16/8/22 18:32	2,326209E+00	2,407890E+04	6,147282E+03
233-C/G	11/08/22	13/08/22	30/8/22 15:28	2,033708E+00	1,531133E+05	3,908943E+04
			30/8/22 15:42	2,693564E+00	2,032899E+05	5,189940E+04
233-I/E	12/08/22	14/08/22	30/8/22 15:56	1,777068E+00	1,044940E+05	2,667705E+04
			30/8/22 16:10	6,156007E+00	3,628697E+05	9,263971E+04
234-C/G	18/08/22	20/08/22	30/8/22 16:24	1,023533E+01	1,332984E+05	3,403075E+04
			30/8/22 16:36	3,950138E+00	5,155225E+04	1,316116E+04
234-I/E	19/08/22	21/08/22	30/8/22 16:51	1,058536E+00	1,076504E+04	2,748288E+03
			30/8/22 17:05	2,126459E+01	2,167861E+05	5,534494E+04
				Média (M):	2,189531E+05	5,589816E+04
				Desvio-padrão (DP):	2,007721E+05	5,125659E+04
				M + 3.DP:	8,212693E+05	2,096679E+05

* Relacionado ao bioindicador utilizado na autoclavação do Mo-99 (matéria-prima do GERADOR IPEN-TEC). Cada processo de autoclavação é acompanhado por 02 (duas) ampolas de bioindicador

** Atividade corrigida pelo decaimento de Mo-99 (meia-vida de 65,94 h) a partir das 12:00 h da data de término da incubação

*** Massa média de uma ampola de bioindicador: 3,917 g (média de 20 ampolas cheias)

A atividade estimada ao término do período de incubação é inferior aos limites de dispensa preconizados pela norma NN 8.01 (CNEN, 2014), para os três radionuclídeos. A concentração de atividade, porém, mostrou-se superior ao limite normativo nos três casos. Por esse motivo, a concentração de atividade foi tomada como referência para o cálculo do tempo de decaimento até que seja atingido o limite de dispensa. Utilizando a expressão (1), obtivemos os seguintes resultados aproximados: ampolas com Mo-99, 31 dias; ampolas com Tl-201, 16 dias; ampolas com Ga-67, 13 dias.

TABELA 2 – Estimativa da atividade radioativa residual (em termos de Tálcio-201) em ampolas de bioindicador, amostradas do processo produtivo do CARD-IPEN, com exclusão das amostras medidas após intervalo superior a dez meias-vidas físicas do término de incubação

Lote de CARD-IPEN*	Data - início da incubação	Data - término da incubação	Medição da atividade		Atividade - término da incubação (Bq)***	Concentração de atividade - término da incubação (kBq/kg)****
			Data/horário	Atividade (kBq)**		
230-A	25/07/22	27/07/22	28/7/22 17:24	< 1,53E-01	2,267920E+02	5,789942E+01
232-A	08/08/22	10/08/22	12/8/22 16:40	< 9,63E-02	1,781049E+02	4,546973E+01
240-A	03/10/22	05/10/22	21/10/22 18:16	< 1,05E-01	4,808883E+03	1,227695E+03
Média (M):					1,737927E+03	4,436882E+02
Desvio-padrão (DP):					2,659638E+03	6,789987E+02
M + 3.DP:					9,716840E+03	2,480684E+03

* Relacionado ao bioindicador utilizado na autoclavação do Tl-201 (matéria-prima do CARD-IPEN).

** Nas ocorrências de atividade não-detectável do Tl-201, foi registrada a Atividade Mínima Detectável (" $<$ valor") como referência para a correção de atividade pelo decaimento.

*** Atividade corrigida pelo decaimento de Tl-201 (meia-vida de 72,912 h) a partir das 12:00 h da data de término da incubação.

**** Massa média de uma ampola de bioindicador: 3,917 g (média de 20 ampolas cheias)

O tempo calculado para decaimento do Mo-99, por ser o mais longo, foi considerado como referência para o teste de filtração em membrana com bioindicadores submetidos a três condições simuladas de autoclavação, em dois momentos (logo após incubação, e após o tempo de decaimento calculado). As circunstâncias particulares de funcionamento do

laboratório no final de ano implicaram a adoção de intervalo pouco mais estendido na execução dos testes (34 dias, vide item 2.2.3), o que a nosso ver não compromete as conclusões deste trabalho.

Os resultados dos testes estão descritos a seguir, e representados no APÊNDICE C:

(a) Carga elevada, sem decaimento: colônias em número muito numeroso para contagem (superior a 100 UFC);

TABELA 3 – Estimativa da atividade radioativa residual (em termos de Gálio-67) em ampolas de bioindicador, amostradas do processo produtivo do GAL-IPEN, com exclusão das amostras medidas após intervalo superior a dez meias-vidas físicas do término de incubação

Lote de GAL-IPEN*	Data - início da incubação	Data - término da incubação	Medição da atividade		Atividade - término da incubação (Bq)***	Concentração de atividade - término da incubação (kBq/kg)****
			Data/horário	Atividade (kBq)**		
230-A	21/07/22	23/07/22	1/8/22 10:11	< 2,18E-02	1,615844E+02	4,125208E+01
231-A	27/07/22	29/07/22	2/8/22 17:41	7,918801E-02	2,167272E+02	5,532990E+01
232-A	04/08/22	06/08/22	12/8/22 16:58	< 2,10E-02	8,736542E+01	2,230417E+01
233-A	11/08/22	13/08/22	30/8/22 15:01	1,200697E-01	5,086912E+03	1,298676E+03
234-A	18/08/22	20/08/22	30/8/22 15:15	< 1,82E-02	1,745058E+02	4,455088E+01
240-A	29/09/22	01/10/22	21/10/22 18:30	< 2,24E-02	1,851764E+03	4,727506E+02
246-A	11/11/22	13/11/22	8/12/22 15:51	< 1,51E-02	3,528923E+03	9,009248E+02
247-A	18/11/22	20/11/22	8/12/22 16:52	< 1,51E-02	8,042019E+02	2,053107E+02
251-A	15/12/22	17/12/22	13/1/23 16:58	< 1,16E-02	4,188338E+03	1,069272E+03

TABELA 3 (continuação)

252-A	22/12/22	24/12/22	13/1/23 17:13	< 1,50E-02	1,225893E+03	3,129672E+02
				Média (M):	1,732621E+03	4,423338E+02
				Desvio-padrão (DP):	1,872079E+03	4,779370E+02
				M + 3.DP:	7,348859E+03	1,876145E+03

* Relacionado ao bioindicador utilizado na autoclavação do Ga-67 (matéria-prima do GAL-IPEN).

** Nas ocorrências de atividade não-detectável do Ga-67, foi registrada a Atividade Mínima Detectável (" $<$ valor") como referência para a correção de atividade pelo decaimento.

*** Atividade corrigida pelo decaimento de Ga-67 (meia-vida de 3,2612 dias) a partir das 12:00 h da data de término da incubação

**** Massa média de uma ampola de bioindicador: 3,917 g (média de 20 ampolas cheias)

(b) Carga elevada, com decaimento: colônias em número muito numeroso para contagem (superior a 100 UFC);

(c) Carga eliminada, sem decaimento: ausência de colônias;

(d) Carga eliminada, com decaimento: ausência de colônias;

(e) Carga reduzida, sem decaimento: 49 UFC;

(f) Carga reduzida, com decaimento: ausência de colônias.

O período de decaimento não provocou redução significativa da carga microbiana nas ampolas não-autoclavadas (carga elevada), ao contrário do que ocorreu no teste de carga reduzida. A população reduzida de microrganismos sobreviveu à incubação a (60 ± 1) °C por 48 horas, com perda total de viabilidade após incubação estendida em 34 dias, o que se espera de população microbiana em fase pós-estacionária. Os testes de carga eliminada confirmaram a efetividade do processo de autoclavação, com ausência de crescimento microbiano nas incubações de 48 horas e 36 dias. Ressalte-se a modificação na coloração do conteúdo da ampola após 36 dias (violáceo para alaranjado, vide APÊNDICE C), o que pode estar relacionado à degradação química do bioindicador quando incubado a (60 ± 1) °C por período superior ao preconizado (48 horas).



Portanto, os resultados dos testes qualitativos com ampolas logo após a incubação de 48 horas se mostraram compatíveis com as três condições simuladas de autoclavação, denotando a pertinência do teste qualitativo proposto com situações de rotina na esterilização dos produtos GAL-IPEN, CARD-IPEN e GERADOR IPEN-TEC.

A execução do teste qualitativo após o período de decaimento não se mostrou adequada, em vista da perda de viabilidade dos microrganismos remanescentes da autoclavação. Contudo, não se pode excluir a possibilidade de que tempos mais curtos de incubação e/ou temperaturas diferentes de $(60 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ [$(32,5 \pm 2,5) \text{ }^\circ\text{C}$; $(22,5 \pm 2,5) \text{ }^\circ\text{C}$; $(5,0 \pm 3,0) \text{ }^\circ\text{C}$] resultem em manutenção da viabilidade da população microbiana. Trabalhos complementares poderão ser executados para testar as diferentes condições de incubação. O fato de a atividade residual estimada ser inferior ao limite de dispensa para os radionuclídeos Ga-67, Tl-201 e Mo-99, sinaliza que a abertura da ampola ao término da incubação representa risco radiológico moderado, gerenciável com medidas ordinárias de proteção radiológica (uso de luvas e de paramentação para área controlada, descarte apropriado dos resíduos analíticos).

3 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O teste qualitativo de filtração em membrana para detecção de *G. stearothernophilus* nas ampolas do bioindicador Sterikon[®] plus é adequado para avaliar as ampolas autoclavadas e incubadas a $(60 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas, e que apresentem conteúdo com coloração variante de vermelha-clara a vermelha-violácea (esterilização eficaz) e de amarelada a amarelada-alaranjada (esterilização ineficaz).

Recomendamos medidas ordinárias de proteção radiológica na manipulação das ampolas, que usualmente portam traços de radionuclídeos com atividade inferior aos limites de dispensa preconizados pela norma CNEN NN 8.01.

A técnica a ser empregada para o teste qualitativo está embasada neste trabalho, e segue descrita no ANEXO A1.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA, 2019a). Instrução normativa n° 35, de 21 de agosto de 2019. Dispõe

sobre as boas práticas de fabricação complementares a medicamentos estéreis. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 22 ago. 2019. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5389382/IN_35_2019_COMP.pdf/bf4ab3da-b130-43ab-913d-243fd2efb86f>. Acesso em 30/01/2023.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA, 2019b). *Farmacopeia brasileira–volume 1*. 6. ed. Brasília, Fundação Oswaldo Cruz (ed.), 2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA, 2022). Resolução da diretoria colegiada n° 738, de 28 de julho de 2022. Dispõe sobre o registro, notificação, importação e controle de qualidade de radiofármacos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 01 ago. 2022. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6469089/RDC_738_2022_.pdf/bb64a637-a7a0-4aea-bcda-38518f36d523>. Acesso em 26/01/2023.

CHU, S.Y.F.; EKSTRÖM, L.P.; FIRESTONE, R.B. *WWW Table of Radioactive Isotopes, database version 1999-02-28*. Disponível em: <<http://nucleardata.nuclear.lu.se/toi/>>. Acesso em 08/02/2023.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN, 2013). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Radiofarmácia. Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$: fracionamento. Sistema de gestão integrada do centro de radiofarmácia (SGI-CR), disponível em: <<http://qualidade.ipen.br/Html-cr/Atualiza%E7%E3o-CR/2.4-IT-CR%20Instru%E7%F5es%20de%20Trabalho/2.4.2-IT-CR-P/IT-CR-P03.10.02.pdf>>. Acesso em 30/01/2023. Restrito.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN, 2014). Norma CNEN NN 8.01 – Gerência de rejeitos radioativos de baixo e médio níveis de radiação. Disponível



em:<<https://www.gov.br/cnen/pt-br/acesso-rapido/normas/grupo-8/grupo8-nrm801.pdf>>.

Acesso em 08/02/2023.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN, 2015). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Radiofarmácia. GAL-IPEN: distribuição. Sistema de gestão integrada do centro de radiofarmácia (SGI-CR), disponível em: <<http://qualidade.ipen.br/Html-cr/Atualização-CR/2.4-IT-CR%20Instruções%20de%20Trabalho/2.4.2-IT-CR-P/IT-CR-P03.12.02.pdf>>. Acesso em 30/01/2023. Restrito.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN, 2022). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Radiofarmácia. CARD-IPEN: produção. Sistema de gestão integrada do centro de radiofarmácia (SGI-CR), disponível em: <<http://qualidade.ipen.br/Html-cr/Atualiza%E7%E3o-CR/2.4-IT-CR%20Instru%E7%E5es%20de%20Trabalho/2.4.2-IT-CR-P/IT-CR-P03.13.02.pdf>>. Acesso em 30/01/2023. Restrito.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR (CNEN, 2023). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Radiofarmácia. Processos de esterilização por autoclavagem (calor úmido). Sistema de gestão integrada do centro de radiofarmácia (SGI-CR), disponível em: <<http://qualidade.ipen.br/Html-cr/Atualização-CR/2.4-IT-CR%20Instruções%20de%20Trabalho/2.4.4-IT-CR/IT-DIRF-1001.01.pdf>>. Acesso em 31/01/2023. Restrito.

MERCK-MILLIPORE. Sterikon® plus bioindicador. Merck microbiology manual 12th edition, disponível em: <https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Sterikon-plus-Bioindicator,MDA_CHEM-110274#anchor_TI>. Acesso em 30/01/2023.

APÊNDICE A

Estimativa da atividade radioativa residual (em termos de Tório-232) em ampolas de bioindicador, amostradas do processo produtivo do CARD-IPEN

Lote de CARD-IPEN*	Data - início da incubação	Data - término da incubação	Medição da atividade		Atividade - término da incubação (Bq)***	Concentração de atividade - término da incubação (kBq/kg)****
			Data/horário	Atividade (kBq)**		
230-A	25/07/22	27/07/22	28/7/22 17:24	< 1,53E-01	2,267920E+02	5,789942E+01
232-A	08/08/22	10/08/22	12/8/22 16:40	< 9,63E-02	1,781049E+02	4,546973E+01
236-A	08/09/22	10/09/22	21/10/22 18:58	< 9,90E-02	1,369531E+06	3,496377E+05
240-A	03/10/22	05/10/22	21/10/22 18:16	< 1,05E-01	4,808883E+03	1,227695E+03
244-A	31/10/22	02/11/22	13/1/23 15:51	< 6,33E-02	1,002802E+09	2,560128E+08
246-A	14/11/22	16/11/22	13/1/23 16:04	< 8,20E-02	5,336708E+07	1,362448E+07
248-A	28/11/22	30/11/22	13/1/23 16:18	< 7,34E-02	1,962795E+06	5,010964E+05
249-A	02/12/22	04/12/22	13/1/23 16:31	< 6,34E-02	6,820975E+05	1,741377E+05
250-A	12/12/22	14/12/22	13/1/23 16:45	< 8,19E-02	9,017608E+04	2,302172E+04
Média (M):					1,178088E+08	3,007628E+07
Desvio-padrão (DP):					3,323319E+08	8,484349E+07
M + 3.DP:					1,114805E+09	2,846067E+08

* Relacionado ao bioindicador utilizado na autoclavação do Tl-201 (matéria-prima do CARD-IPEN).

** Nas ocorrências de atividade não-detectável do Tl-201, foi registrada a Atividade Mínima Detectável (" $<$ valor") como referência para a correção de atividade pelo decaimento.

*** Atividade corrigida pelo decaimento de Tl-201 (meia-vida de 72,912 h) a partir das 12:00 h da data de término da incubação.

**** Massa média de uma ampola de bioindicador: 3,917 g (média de 20 ampolas cheias)

APÊNDICE B

Estimativa da atividade radioativa residual (em termos de Gálio-67) em ampolas de bioindicador, amostradas do processo produtivo do GAL-IPEN

Lote de GAL-IPEN*	Data - início da incubação	Data - término da incubação	Medição da atividade		Atividade - término da incubação (Bq)***	Concentração de atividade - término da incubação (kBq/kg)****
			Data/horário	Atividade (kBq)**		
230-A	21/07/22	23/07/22	1/8/22 10:11	< 2,18E-02	1,615844E+02	4,125208E+01
231-A	27/07/22	29/07/22	2/8/22 17:41	7,918801E-02	2,167272E+02	5,532990E+01
232-A	04/08/22	06/08/22	12/8/22 16:58	< 2,10E-02	8,736542E+01	2,230417E+01
233-A	11/08/22	13/08/22	30/8/22 15:01	1,200697E-01	5,086912E+03	1,298676E+03
234-A	18/08/22	20/08/22	30/8/22 15:15	< 1,82E-02	1,745058E+02	4,455088E+01
238-A	15/09/22	17/09/22	21/10/22 18:44	< 1,51E-02	2,451595E+04	6,258858E+03
239-A	22/09/22	24/09/22	8/12/22 15:38	< 1,07E-02	1,029253E+08	2,627655E+07
240-A	29/09/22	01/10/22	21/10/22 18:30	< 2,24E-02	1,851764E+03	4,727506E+02
241-A	06/10/22	08/10/22	8/12/22 15:25	< 1,07E-02	5,241173E+06	1,338058E+06
242-A	13/10/22	15/10/22	8/12/22 15:07	< 1,51E-02	1,666173E+06	4,253697E+05
243-A	21/10/22	23/10/22	8/12/22 16:09	< 1,07E-02	2,175983E+05	5,555229E+04
244-A	28/10/22	30/10/22	8/12/22 16:23	< 1,07E-02	4,924529E+04	1,257219E+04
245-A	04/11/22	06/11/22	8/12/22 16:39	< 1,51E-02	1,573403E+04	4,016858E+03
246-A	11/11/22	13/11/22	8/12/22 15:51	< 1,51E-02	3,528923E+03	9,009248E+02
247-A	18/11/22	20/11/22	8/12/22 16:52	< 1,51E-02	8,042019E+02	2,053107E+02



251-A	15/12/22	17/12/22	13/1/23 16:58	< 1,16E-02	4,188338E+03	1,069272E+03
252-A	22/12/22	24/12/22	13/1/23 17:13	< 1,50E-02	1,225893E+03	3,129672E+02
				Média (M):	6,479825E+06	1,654283E+06
				Desvio-padrão (DP):	2,488738E+07	6,353684E+06
				M + 3.DP:	8,114196E+07	2,071533E+07

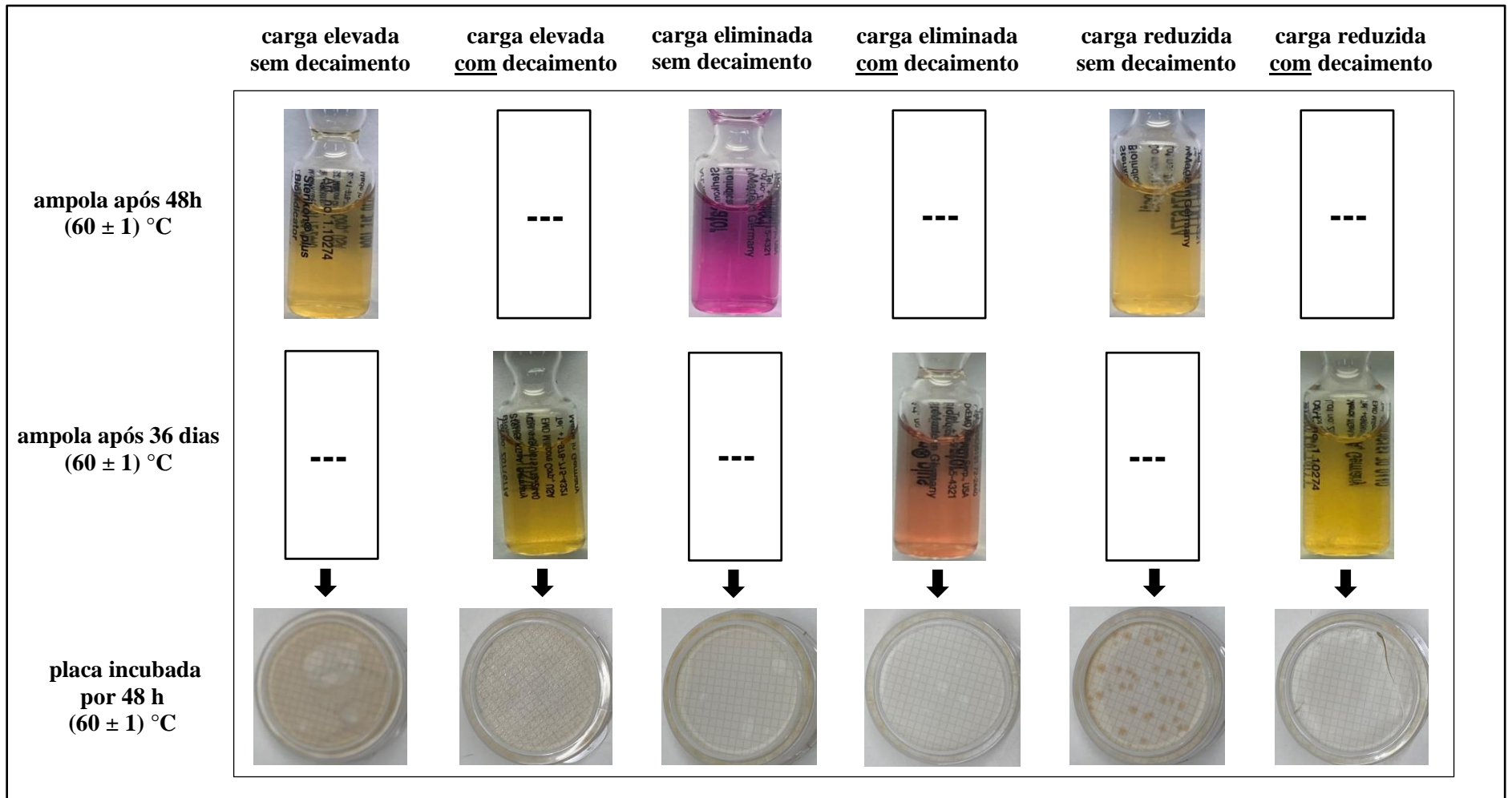
* Relacionado ao bioindicador utilizado na autoclavação do Ga-67 (matéria-prima do GAL-IPEN).

** Nas ocorrências de atividade não-detectável do Ga-67, foi registrada a Atividade Mínima Detectável (" $<$ valor") como referência para a correção de atividade pelo decaimento.

*** Atividade corrigida pelo decaimento de Ga-67 (meia-vida de 3,2612 dias) a partir das 12:00 h da data de término da incubação

**** Massa média de uma ampola de bioindicador: 3,917 g (média de 20 ampolas cheias)

Reporte fotográfico do teste de filtração em membrana com bioindicadores submetidos a três condições simuladas de autoclavação, em dois momentos (logo após incubação, e após o tempo de decaimento calculado)



ANEXO A1

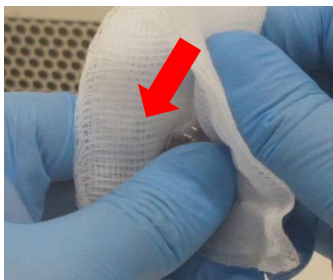
Proposta para o teste qualitativo de detecção do *Geobacillus stearothermophilus* em ampolas do bioindicador Sterikon[®] plus (Merck-Millipore)

(a ser adaptado e inserido na instrução de trabalho IT-CR-C01.28, “Ensaio de contagem microbiana através de filtração por membrana (MILLIFLEX[®])”)

- Adicionar aproximadamente 80 mL de solução de rinsagem (Fluido A) ao funil de filtração.
- Aplicar desinfetante sobre a superfície da lima agulha triangular, da gaze e da ampola testada.
- Apoiar a ampola na gaze umedecida.
- Com a lima, marcar um sulco ao redor da região mais afilada da ampola, da forma que segue:



- Quebrar a ampola, ainda apoiada na gaze, aplicando força na direção do operador, da forma que segue:



- Descarte a parte superior da ampola em recipiente forrado com saco plástico ou papel alumínio. Esse descarte será utilizado para outros materiais potencialmente radioativos (gaze, parte inferior da ampola, ponteiros), e, ao final do teste, será


acondicionado em bombona plástica identificada como de resíduos biológicos e radioativos.

- Pipetar todo o conteúdo da ampola (2 mL) para o fluido de rinsagem no funil de filtração, em frações de 200 µL (utilizar micropipeta de 20 – 200 µL).
- Adicionar solução de rinsagem ao funil de filtração, em quantidade suficiente para obter o volume final de 100 mL. Filtrar.
- Acoplar a membrana filtrante ao meio de cultura ágar TSA.
- Incubar a placa com a membrana voltada para baixo, a (60 ± 1) °C, por 2 dias.
- Verificar a presença ou ausência de colônias microbianas ao final do período de incubação, em ambos os lados da membrana. As colônias se apresentam de levemente amareladas a translúcidas, com centro mais opaco que a borda.
- Expressão dos resultados: por se tratar de um teste qualitativo, não se aplica o registro do número de contagens na placa.
 - Presença de colônias microbianas: não conforme (esterilização ineficaz).
 - Ausência de colônias microbianas: conforme (esterilização eficaz).



ANEXO B1

Certificados de análise Merck-Millipore (digitalizados) – bioindicadores

			
<h1>Certificate of Analysis</h1>			
1.10274.0002 Sterikon® plus Bioindicator for checks on autoclaving			
Batch Z0716774			
	Spec. Values	Batch Values	
Appearance	opalescent and reddish violet	passes test	
Number of viable spores per ampule	5.0•10 ⁸ - 1.0•10 ⁷	5.3•10 ⁸	
Growth (35 °C)	no growth	passes test	
Growth (60 °C)	growth	passes test	
Performance test (6 min, 121 °C)	Survival time 6 min/121 °C	passes test	
Performance test (15 min, 121 °C)	Kill time 15 min/121 °C	passes test	
D value (121 °C)	1.5 - 2.0 min	1.7	min
Z value	7.0 - 10.0 °C	9.0	°C
Identity	Geobacillus stearo-thermophilus ATCC 7953	passes test	
<p>The determination of the D-value is based on the Stumbo-Murphy-Cochran method.</p> <p>The Identity control is carried out via MicroSeq-System.</p> <p>Organism: Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953 (sporulation optimized). Ampoules: 2 ml. Storage temperature: +2° to +8°C.</p> <p>Date of release (DD.MM.YYYY) 04.08.2021 Expiry date (DD.MM.YYYY) 15.01.2023</p> <p style="text-align: right;"><u>Stefanie Fischer</u> Responsible laboratory manager quality control</p> <p>This document has been produced electronically and is valid without a signature.</p>			
Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0		Page 1 of 1	
EMD Millipore Corporation - a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany			
400 Summit Drive, Burlington, MA 01803, USA, Phone +1 (781) 533-6000			
<small>SALSA Version 1102136/990000669101 Date: 04.08.2021</small>			



Certificate of Analysis

1.10274.0002 Sterikon® plus Bioindicator for checks on autoclaving
 Batch Z0768474

	Spec. Values	Batch Values
Appearance	opalescent and reddish violet	passes test
Number of viable spores per ampule	$5.0 \cdot 10^5 - 1.0 \cdot 10^7$	$1.4 \cdot 10^6$
Growth (35 °C)	no growth	passes test
Growth (60 °C)	growth	passes test
Performance test (6 min, 121 °C)	Survival time 6 min/121 °C	passes test
Performance test (15 min, 121 °C)	Kill time 15 min/121 °C	passes test
D value (121 °C)	1.5 - 2.0 min	1.8 min
Z value	7.0 - 10.0 °C	9.9 °C
Identity	Geobacillus stearo-thermophilus ATCC 7953	passes test

The determination of the D-value is based on the Stumbo-Murphy-Cochran method.

The identity control is carried out via MicroSeq-System.

Organism: Geobacillus stearothermophilus ATCC 7953 (sporulation optimized).
 Ampoules: 2 ml.
 Storage temperature: +2° to +8°C.

Date of release (DD.MM.YYYY) 07.04.2022
 Expiry date (DD.MM.YYYY) 16.09.2023

Stefanie Fischer
 Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.