

# Análise comparativa de ampolas e frascos-ampolas em embalagens estéreis e convencionais quanto a carga microbiana e teste de esterilidade

Comparative analysis of ampoules and vials in sterile and conventional packaging as to microbial load and sterility test

Raphael Ribeiro de Aquino Freitas<sup>1</sup>, Maria Angela Tardelli<sup>1</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Comparar a esterilidade e a carga microbiana (bactérias e fungos) da parte externa dos frascos de envasamento de bupivacaína hiperbárica (Neocaína<sup>®</sup>) em ampola e bupivacaína em frasco-ampola das apresentações convencional e estéril (*sterile pack*). **Métodos:** As apresentações estéreis (*sterile pack*) foram distribuídas em dois grupos, sendo que o G1 (n=16) continha as ampolas e o G2 (n=16), os frascos-ampola. As apresentações convencionais foram distribuídas em dois grupos, a saber G3 (n=16) com as ampolas e G4 (n=16) com os frascos-ampola. As ampolas e os frascos-ampolas eram abertos e tinham seu conteúdo aspirado. Os frascos vazios eram, então, acondicionados em sacos plásticos estéreis e enviados para análise quanto à carga microbiana (bactérias e fungos), bem como para o teste de esterilidade. Os dados foram analisados por meio do teste  $\chi^2$  com correção Yates com intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** Os grupos G1 e G2 não apresentaram crescimento bacteriano quando comparado aos grupos convencionais ( $p < 0,001$ ). O microbiano mais comum nas amostras convencionais foi o *Staphylococcus aureus*. Não houve crescimento de fungos em nenhum dos grupos. **Conclusão:** O uso de embalagens estéreis (*sterile pack*) diminui a carga microbiana dos frascos de envasamentos, o que diminuiria a chance de exposição a uma potencial contaminação da solução anestésica.

**Descritores:** Controle de infecções; Anestesia; Contaminação; Anestesia por condução

## ABSTRACT

**Objective:** To compare sterility and microbial (bacteria and fungi) load in the outer part of hyperbaric bupivacaine (Neocaína<sup>®</sup>) in ampoule and bupivacaine in vial, in conventional and sterile pack formulations. **Methods:** The sterile packs were divided into two groups: G1 (n=16)

with ampoules and G2 (n=16) with vials. Conventional formulations were divided into two groups, being G3 (n=16) with ampoules and G4 (n=16) with vials. The ampoules and vials were opened and had their content drawn. The empty bottles were then placed in sterile plastic bags and sent for analysis of microbial load (bacteria and fungi) and sterility testing. Data were analyzed using the  $\chi^2$  test with Yates correction, and 95% confidence interval. **Results:** G1 and G2 showed no bacterial growth when compared to conventional groups ( $p < 0.001$ ). The most common agent in conventional microbiological samples was *Staphylococcus aureus*. There was no fungal growth in both groups. **Conclusion:** The use of (sterile pack) reduces the microbial load of bottles, and would decrease the chance of exposure to potential contamination of the anesthetic solution.

**Keywords:** Infection control; Anesthesia; Contamination; Anesthesia, conduction

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a anestesia espinhal (peridural, subaracnoide ou duplo-bloqueio) alcançou ampla gama de aplicações na medicina moderna. Ela é realizada principalmente em obstetrícia, ginecologia e operações de membros inferiores, bem como no tratamento da dor pós-operatória aguda e crônica.<sup>(1)</sup> No entanto, essas técnicas não estão livres de complicações, que podem incluir eventos graves, como lesões traumáticas de estruturas nervosas, hematomas peridurais, infecções como abscesso peridural e paravertebral, e meningite bacteriana aguda.<sup>(2-5)</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Autor correspondente: Raphael Ribeiro de Aquino Freitas – Rua Napoleão de Barros, 715, 5ª andar – Vila Clementino – CEP: 04024-002 – São Paulo, SP, Brasil – Tel.: (11) 5576-4069  
E-mail: raphael.unifesp@gmail.com

Data de submissão: 31/10/2015 – Data de aceite: 27/1/2016

Conflitos de interesse: Este projeto foi financiado pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos para amostras, material utilizado durante a coleta e análise das amostras em laboratório.

DOI: 10.1590/S1679-45082016AO3484

Fontes endógenas ou exógenas de microrganismos podem entrar nos espaços subaracnóideo ou peridural por meio da inoculação direta, da disseminação hematogênica de outro sítio e de migrações ao longo do cateter da pele ou tecido subcutâneo. Vários relatos de casos sugerem que os microrganismos da microbiota do paciente ou do anestesiológista podem ser inoculados diretamente na inserção da agulha ou do cateter nesses espaços, ou quando as soluções de frascos anestésicos, cuja parte externa não está estéril, são administradas aos pacientes.<sup>(6)</sup> Muitos investigadores têm coletado culturas de agulhas, seringas e tubos utilizados para administrar anestesia regional, com o intuito de verificar quando esses itens se tornam contaminados para o uso e, conseqüentemente, podem se tornar uma fonte de infecção. Estudos demonstraram que a incidência de contaminação dos dispositivos foi de zero a 33%, mas nenhum dos investigadores identificou pacientes infectados. Além do mais, eles não puderam correlacionar a fonte da contaminação com a infecção.<sup>(6,7)</sup>

Casos de meningite após a realização de anestesia regional foram descritos na literatura.<sup>(2)</sup> Os mecanismos propostos como fonte de infecção das meninges são múltiplos. No primeiro, o microrganismo pode ser introduzido durante a inserção de agulha ou cateter contaminados, o que explicaria a maioria dos casos relacionados à anestesia espinal. Os microrganismos envolvidos são o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus* spp., descritos em mais de 50% dos casos. A origem destes microrganismos, por vezes, é a nasofaringe do médico.<sup>(8)</sup> Essa situação pode ocorrer quando as medidas de assepsia durante o procedimento são inadequadas, como a não utilização correta de máscara pela equipe envolvida na realização do bloqueio. Em segundo lugar, agulhas e cateter podem ser contaminados por bactérias que residam na pele e podem, posteriormente, migrar ao longo da superfície da pele para o espaço subaracnóideo.<sup>(9)</sup> Isto explicaria a maioria das infecções secundárias à analgesia espinal crônica, sendo a etiologia mais comum o *Staphylococcus aureus*. Em terceiro lugar, pode haver uma propagação hematogênica de uma fonte distante da infecção, com a contaminação do espaço subaracnóideo ocorrendo com a passagem do sangue para ele durante a punção.<sup>(10)</sup> Finalmente, a infusão de substâncias contaminadas tem sido a fonte em um pequeno número de casos, alguns dos quais fatais.<sup>(10)</sup> O espectro etiológico de meningite associada à anestesia regional é amplo: *Streptococcus* do grupo *viridans*, outras espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp., *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter* e até mesmo *Aspergillus*.<sup>(11)</sup>

Apesar de raras, as complicações infecciosas da anestesia regional podem ser devastadoras. Os anestesiológistas desempenham importante papel na prevenção de infecções hospitalares. Na prática anestésica, rotineiramente são realizados procedimentos invasivos que ultrapassam as barreiras fisiológicas, como intubação traqueal, acesso venoso ou bloqueios do neuroeixo, o que possibilita a contaminação do paciente por microrganismos e o desenvolvimento de infecção. A não adesão a práticas recomendadas pode facilitar a transmissão de microrganismos do anestesiológista para o paciente, do paciente para o anestesiológista, e entre pacientes.<sup>(12)</sup> Entre os aspectos importantes para a redução do risco de transmissão de infecção, encontram-se as práticas de higiene do profissional, a adequação da limpeza dos equipamentos e a execução adequada dos procedimentos invasivos.<sup>(6)</sup>

Os anestésicos locais e os opioides que habitualmente são utilizados por via peridural ou subaracnóidea provêm de envasamentos cujas partes externas ficam expostas a patógenos do meio, sendo potencialmente uma fonte de contaminação. A forma de abertura das ampolas e manipulação das mesmas também raramente é realizada de maneira padronizada. A possível contaminação pode ocorrer durante as várias etapas do processo, que envolve desde a manipulação da ampola até o momento da administração de seu conteúdo.

## OBJETIVO

Comparar a esterilidade e a carga microbiana (bactérias e fungos) da parte externa dos frascos de envasamento de bupivacaína hiperbárica (Neocaína®) em ampola e bupivacaína em frasco-ampola das apresentações convencional e estéril (*sterile pack*).

## MÉTODOS

O estudo foi realizado no centro cirúrgico do Hospital São Paulo, com coordenação do serviço de anestesia pela Disciplina de Anestesiologia, Dor e Medicina Intensiva da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, sob protocolo 0860/11 do Comitê de Ética em Pesquisa.

As apresentações estéreis (*sterile pack*) de Neocaína® (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, São Paulo, Brasil) foram distribuídas em dois grupos: G1 com ampolas de 4mL (cloridrato de bupivacaína a 0,5% + glicose 8%) e G2 com frascos-ampola de 20mL (cloridrato de bupivacaína 0,5% sem vasoconstrictor).

As apresentações convencionais de Neocaína® (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, São

Paulo, Brasil) foram distribuídas em dois grupos: G3 com as ampolas e G4 com os frascos-ampola.

A análise foi realizada com 16 amostras de cada grupo, totalizando 64 amostras. As coletas foram realizadas entre 7 e 11h durante 5 dias. Esses medicamentos foram retirados da própria farmácia do Hospital São Paulo, utilizando-se o percurso natural dos medicamentos e não pertenciam necessariamente ao mesmo lote.

As amostras foram criteriosamente identificadas com as datas e horários pertinentes ao estudo e, até o início dos procedimentos analíticos, as amostras foram mantidas sob refrigeração e, então, encaminhadas ao laboratório de análise.

O fluxograma da sequência de coleta de amostras está na figura 1.

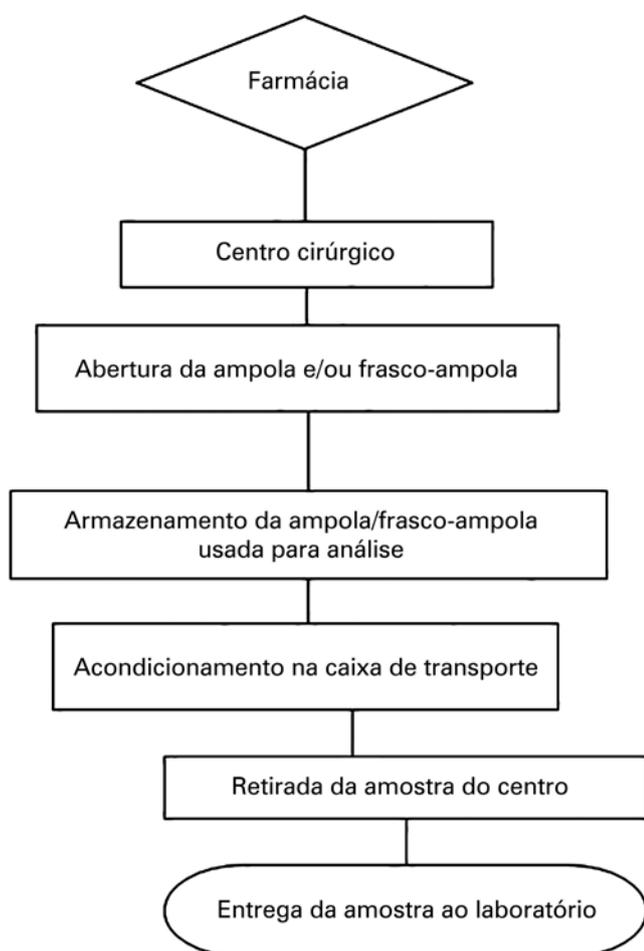


Figura 1. Fluxograma de coleta das amostras

Para a coleta, o anestesista se paramentou com gorro e máscara, e realizou a assepsia das mãos com degermante de clorexidina para iniciar o procedimento de manipulação do medicamento conforme a rotina do serviço, após o calçamento de luvas estéreis. Uma

pessoa designada pelo anestesista retirou e manipulou a ampola e o frasco-ampola convencionais. O pesquisador principal assegurou a padronização das coletas nos diferentes grupos.

Nos grupos G1 e G2, o ajudante abriu as embalagens *sterile pack* da ampola e do frasco-ampola, e as colocou na bandeja estéril. O anestesista quebrou a cabeça da ampola para a aspiração de todo o conteúdo em seringa de 5mL, ou retirou a tampa do frasco-ampola para a aspiração de todo o conteúdo em seringa de 20mL. Após aspiração de todo o conteúdo, o anestesista colocou as ampolas e frascos-ampolas *sterile pack* dentro dos sacos estéreis.

Nos grupos convencionais G3 e G4, não houve higienização externa previamente ao uso, conforme a prática clínica habitual. No grupo G3, o ajudante abriu a ampola e a apresentou ao anesthesiologista para aspiração do conteúdo em uma seringa de 5mL. No grupo G4, o ajudante retirou a tampa do frasco-ampola e o apresentou ao anesthesiologista para aspiração do conteúdo em uma seringa de 20mL. As ampolas e frascos-ampolas convencionais foram, então, depositadas nos sacos estéreis pelo ajudante.

Terminado o fechamento dos sacos estéreis, estes foram guardados na geladeira a temperatura de +4°C e +8°C, até que todas as amostras do dia tivessem sido terminadas e, então, encaminhadas para o laboratório Controlbio Assessoria Técnica Microbiológica S/S Ltda. O laboratório segue as normas internacionais ISO 11137-1:2006 e ISO 11137-2:2006.

Apesar de a coleta inicial não contar com cegamento das amostras devido à própria rotina de manuseio, o laboratório que analisou as amostras não tinha conhecimento a que grupo pertenciam.

As ampolas e os frascos-ampola foram analisados qualitativa e quantitativamente quanto à carga microbiana existente na superfície externa. Por meio de movimentos de rotação, os frascos foram colocados em contato com o meio de cultura Ágar sangue. As placas contendo o meio de cultura foram incubadas a 30 a 35°C por um período de 72 horas. Após o tempo de incubação, as placas foram lidas em contador de colônias.

A identificação dos microrganismos foi realizada por provas bioquímicas e laminocultivos, para fungos, e BBL Crystal™, para bactérias.

Para o teste de esterilidade, ampolas e frascos-ampola foram submersos em 50mL de meio líquido (Soybean-Casein Digest Medium ou similar). Estas amostras foram incubadas à temperatura de 30 a 35°C por 14 dias. Após este período, verificou-se a aparência do meio de cultura quanto à turbidez. Dos frascos que se apresentaram turvos, foi retirada uma alíquota

para subcultivo e identificação dos microrganismos. As identificações foram realizadas por meio de método da coloração de *Gram* e o Kit BBL Crystal™.

Os dados foram analisados por  $\chi^2$  com correção Yates com intervalo de confiança de 95%.

## RESULTADOS

Os resultados foram analisados conforme os grupos do estudo.

### Ampola *sterile pack* versus ampola convencional

A avaliação das ampolas mostrou que as de apresentação convencional apresentaram crescimento bacteriano em 13 das 16 (81,25%) amostras submetidas ao ensaio analítico. Dentre os crescimentos bacterianos, encontramos sete amostras com *Staphylococcus aureus*, sete com *Bacillus* spp e uma com *Micrococcus* spp. Houve amostras com mais de uma espécie diferente. Não houve crescimento de fungos em nenhuma das amostras.

As ampolas *sterile pack* não apresentaram nenhum crescimento bacteriano e nem fúngico, nos ensaios analíticos aos quais foram submetidas. Essa diferença obteve  $\chi^2$  de 18,656, com grau de liberdade igual a 1 e  $p < 0,0001$ .

### Frasco-ampola *sterile pack* versus frasco-ampola convencional

A avaliação dos frascos-ampola mostrou que os convencionais apresentaram crescimento bacteriano em 15 das 16 (93,75%) amostras submetidas ao ensaio analítico. Dentre os crescimentos bacterianos, encontramos 12 amostras com *Staphylococcus aureus*, 6 com *Bacillus* spp e 3 com *Micrococcus* spp, sendo que houve amostras com mais de uma espécie diferente. Não houve crescimento de fungos em nenhuma das amostras.

Os frasco-ampolas *sterile pack* não apresentaram nenhum crescimento bacteriano e nem fúngico nos ensaios analíticos aos quais foram submetidos. Essa diferença obteve  $\chi^2$  de 24,596, com grau de liberdade igual a 1 e  $p < 0,0001$ . A tabela 1 apresenta os resultados de cultura microbiana nos grupos convencionais.

**Tabela 1.** Distribuição dos microrganismos identificados nas apresentações convencionais

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus</i> spp	<i>Micrococcus</i> spp
	n (%)	n (%)	n (%)
Ampola (n=16)	7 (54)	7 (54)	1 (6)
Frasco-ampola (n=16)	12 (80)	6 (40)	3 (20)

## DISCUSSÃO

A introdução de patógenos no espaço do neuroeixo pode ocorrer de três maneiras: por meio da contaminação da pele e disseminação subsequentemente ao longo da agulha ou cateter; por extensão direta ou disseminação hematogênica de foco a distância; ou por injeção de solução contaminada.<sup>(13)</sup> Destas três causas, a injeção de solução contaminada é a menos frequente<sup>(14)</sup> e tem recebido relativamente pouca atenção na literatura.

Dessa maneira, o presente estudo teve por objetivo comparar a carga microbiana de frascos apresentados em embalagens estéril ou convencional para avaliar a contribuição desses frascos à exposição dos líquidos a patógenos, durante sua manipulação.

*Sterile pack* é o nome dado às embalagens de anestésicos e adjuvantes submetidos a um processo de esterilização antes de serem utilizados na prática clínica. Consiste em um processo químico de esterilização à baixa temperatura, no qual se utiliza o peróxido de hidrogênio. Esses radicais livres gerados a partir do peróxido de hidrogênio interagem com moléculas essenciais ao metabolismo e à reprodução dos microrganismos, realizando ligações químicas inespecíficas com membranas citoplasmáticas, enzimas, ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), entre outros, que resultam em uma ação esporicida, fungicida, bactericida e virucida, tornando o processo de esterilização viável em curto período de tempo.

O resultado do experimento evidenciou que, quanto à carga microbiana, as ampolas e os frascos-ampola *sterile pack* não apresentam crescimento de patógenos quando comparado com as embalagens convencionais. Esse achado, possivelmente, contribuiria a um menor risco de contaminação microbiana para as soluções anestésicas. No entanto, esse é um fator limitante ao artigo, pois não podemos confirmar a importância da contaminação da solução dependente do tipo de embalagem, pois a metodologia do presente estudo não contemplou a análise do conteúdo das ampolas e frascos-ampola. Estudo prévio já demonstrara que a chance de contaminação da solução injetada pela ampola contaminada é em torno de 1,66%, o que resultaria na necessidade de uma amostra 15 vezes maior que a apresentada no presente estudo.<sup>(15)</sup> Novos estudos devem ser realizados para tentar provar essa relação causal.

Apesar de raras<sup>(16)</sup> as complicações decorrentes de infecção microbiana, a meningite parece ser uma das mais importantes. A literatura atribui ao *Staphylococcus aureus* como sendo a etiologia mais comum das complicações durante o bloqueio regional do neuroeixo.<sup>(9,17)</sup> Tal dado corrobora com os achados do presente estudo em que esse agente esteve presente em 54% das amostras

nas ampolas convencionais e em 80% das amostras dos frascos-ampola convencionais. Não foi encontrado crescimento de *Streptococcus* spp possivelmente devido ao uso de máscara facial pela equipe envolvida no protocolo durante a manipulação dos frascos na execução de bloqueios.

Embora a infecção na anestesia do neuroeixo possa ser conduzida durante a inserção da agulha ou proveniente de falhas na técnica estéril, casos de injeção de solução contaminada também têm sido relatados.<sup>(18)</sup> Apesar de não ser amplamente divulgada, a injeção de solução contaminada pode levar a complicações infecciosas devastadoras em anestesia regional. Adoção de práticas de manipulação de todo material utilizado que minimizem a contaminação deve ser uma prioridade para o anestesista.

## CONCLUSÃO

O uso de embalagens estéreis pode diminuir a chance de exposição a uma potencial contaminação da solução anestésica infundida além de permitir uma maior independência de ajuda e, conseqüentemente, segurança para o preparo do material necessário para realização de anestesia regional.

## REFERÊNCIAS

- Wildsmith JA. Regional anaesthesia. *Anaesthesia*. 2003;58(12):1200-3. Review.
- Reynolds F. Neurological infections after neuraxial anesthesia. *Anesthesiol Clin*. 2008;26(1):23-52, v. Review.
- Schulz-Stübner S, Pottinger JM, Coffin SA, Herwaldt LA. Nosocomial infections and infection control in regional anesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008;52(8):1144-57. Review.
- Smitt PS, Tsafka A, Teng-van de Zande F, van der Holt R, Elswijk-de Vries I, Elfrink E, et al. Outcome and complications of epidural analgesia in patients with chronic cancer pain. *Cancer*. 1998;83(9):2015-22.
- Scholle D, Kipp F, Reich A, Freise H. Influence of protective measures after epidural catheter disconnection on catheter lumen colonization: an in vitro study. *J Hosp Infect*. 2014;86(2):133-7.
- Herwaldt LA, Coffin SA, Schulz-Stübner S. Nosocomial infections associated with anesthesia. In: *Hospital epidemiology and infection control*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2004. p. 1073-117.
- Dawson S. Epidural catheter infections. *J Hosp Infect*. 2001;47(1):3-8. Review.
- Veringa E, van Belkum A, Schellekens H. Iatrogenic meningitis by *Streptococcus salivarius* following lumbar puncture. *J Hosp Infect*. 1995;29(4):316-8.
- Yuan HB, Zuo Z, Yu KW, Lin WM, Lee HC, Chan KH. Bacterial colonization of epidural catheters used for short-term postoperative analgesia: microbiological examination and risk factor analysis. *Anesthesiology*. 2008;108(1):130-7.
- Ready LB, Helfer D. Bacterial meningitis in parturients after epidural anesthesia. *Anesthesiology*. 1989;71(6):988-90.
- Rodrigo N, Perera KN, Ranwala R, Jayasinghe S, Warnakulasuriya A, Hapuarachchi S. *Aspergillus* meningitis following spinal anaesthesia for caesarean section in Colombo, Sri Lanka. *Int J Obstet Anesth*. 2007;16(3):256-60.
- Ross RS, Viazov S, Gross T, Hofmann F, Seipp HM, Roggendorf M. Transmission of hepatitis C virus from a patient to an anesthesiology assistant to five patients. *N Engl J Med*. 2000;343(25):1851-4.
- Holt HM, Andersen SS, Andersen O, Gahrn-Hansen B, Siboni K. Infections following epidural catheterization. *J Hosp Infect*. 1995;30(4):253-60.
- Grewal S, Hocking G, Wildsmith JA. Epidural abscesses. *Br J Anaesth*. 2006;96(3):292-302. Review.
- Ferreira MB, Borba SR, Barcelllos S. Thee risk of contamination by microorganisms with epidural and spinal blocks. *Rev Bras Anesthesiol*. 1988;38(5):333-7.
- Peters N, Upadhyay S, Grewal S, Saini N. Spinal epidural abscess following epidural cannulation for flail chest analgesia: a case report. *Neurol Neurochir Pol*. 2011;45(1):80-3. Review.
- van Rappard JR, Tolenaar JL, Smits AB, Go PM. Spinal epidural abscess and meningitis following short-term epidural catheterisation for postoperative analgesia. *BMJ Case Rep*. 2015;20:2015. pii: bcr2015210867.
- North JB, Brophy BP. Epidural abscess: a hazard of spinal epidural anaesthesia. *Aust N Z J Surg*. 1979;49(4):484-5.