UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM

CHRISTIANE MOREIRA PADOVANI

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES
ANTI-SÉPTICAS – POLIVILIPIRROLIDONA-IODO E CLOREXIDINA –
APÓS CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DAS ALMOTOLIAS**

**SÃO PAULO
2008**

CHRISTIANE MOREIRA PADOVANI

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES
ANTI-SÉPTICAS – POLIVILIPIRROLIDONA-iodo E CLOREXIDINA –
APÓS CONTAMINAÇÃO INTENCIONAL DAS ALMOTOLIAS**

Dissertação apresentada à Escola de
Enfermagem da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Enfermagem.

Área de concentração:

Enfermagem em Saúde do Adulto

Orientadora:

Prof^a Dra. Kazuko Uchikawa Graziano

SÃO PAULO

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Christiane Moreira Padovani

Título: Contaminação microbiana de anti-sépticos relacionada ao recipiente

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Área de concentração: Enfermagem em Saúde do Adulto

Aprovação em: ____/____/____

Banca examinadora

Dra. Júlia Yaeko Kawagoe
Instituição: Hospital Israelita Albert Einstein
Assinatura: _____

Prof. Dr. Waldemar Francisco
Instituição: Santa Casa de São Paulo
Assinatura: _____

Dra. Tânia Mara Varejão Strabelli
Instituição: Instituto do Coração da FMUSP
Assinatura: _____

Prof. Dra. Marines Dalla Valle Martino
Instituição: Santa Casa de São Paulo
Assinatura: _____

Prof. Dra. Rúbia Aparecida Lacerda
Instituição: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
Assinatura: _____

Prof. Dra. Ruth Natália Teresa Turrini
Instituição: Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
Assinatura: _____

Este trabalho foi desenvolvido na Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, no Programa de Pós-graduação estrito senso, do Programa Enfermagem na Saúde do Adulto - PROESA, com o apoio financeiro da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que sempre estarão presentes em cada vitória conquistada, como estiveram em cada momento da minha vida.

Obrigada pelo carinho, apoio e exemplo nesses 26 anos.

Eu amo vocês!!

A toda minha família que, mesmo à distância, sempre acompanha meu desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

À admirável professora Kazuko, pela oportunidade, carinho e paciência. Você faz parte de uma grande etapa da minha formação profissional e eu a respeito muito por tudo o que você representa.

À minha querida irmã Débora, com quem sempre dividi todas as etapas da minha vida.

Ao João Paulo, pela segurança emocional e retaguarda. Obrigada pelo seu carinho e amor!

Ao Dr. Waldemar Francisco, pelos ensinamentos durante meu estágio no laboratório da Santa Casa.

À equipe do Laboratório de Microbiologia do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar da Santa Casa de São Paulo, em especial à Maura Miranda, pelo acompanhamento e paciência constantes.

À Vânia Gouveia, pelas contribuições enriquecedoras e acolhimento nos momentos em que mais precisei, durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos participantes do Grupo de Pesquisa do CNPq, pelas valiosas sugestões e discussões, especialmente à Júlia Kawagoe e à Silma Pinheiro.

Às colegas de trabalho, Cristhieni Rodrigues e Dra Tânia Strabelli, pelo incentivo e apoio desde o início da minha carreira profissional.

À Margarita Araya da Central de Esterilização por óxido de etileno Sterileno, pela atenção e disponibilidade para o desenvolvimento deste estudo.

À FAPESP, cujo apoio financeiro tornou possível a realização deste trabalho.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, me acompanharam nesta jornada...Muito obrigada!

*“O futuro não pode ser previsto, mas pode ser inventado.
É a nossa habilidade de inventar o futuro que nos dá esperança
para fazer de nós o que somos.”*

Dennis Gabor

PADOVANI CM. Avaliação microbiológica das diferentes formulações anti-sépticas – polivinilpirrolidona-iodo e clorexidina – após contaminação intencional das almotolias [dissertação]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2008.

RESUMO

Introdução: Há relatos na literatura sobre anti-sépticos que sofreram contaminação, reportados como causas de surtos de infecção em estabelecimentos de assistência à saúde. Em relação aos recipientes que veiculam essas soluções, a preferência por almotolias descartáveis, de pequeno volume, que possibilitem a individualização do uso e o consumo rápido do produto é largamente difundida. No entanto, constata-se que a utilização de almotolias coletivas e reprocessáveis, tem sido a prática mais comum nas instituições de saúde do país. A forma de processamento de almotolias para envase de anti-sépticos não está esclarecida na literatura e é amplamente discutida nos serviços de saúde sem respaldo científico.

Objetivos: os objetivos deste estudo constituíram-se em avaliar a sobrevivência dos microrganismos nas diferentes formulações dos anti-sépticos – CHX e PVPI-I – após contaminação intencional das almotolias com *Serratia marcescens* e extrapolar os resultados laboratoriais para o cuidado mínimo a ser dispensado às almotolias de múltiplo uso para o envase dos anti-sépticos testados. **Método:** Foi conduzido um estudo laboratorial, em que 180 almotolias foram contaminadas com 1×10^5 UFC/mL de suspensão contendo *S. marcescens*. Nas almotolias contaminadas, foram distribuídos 150 mL das seis diferentes formulações de anti-sépticos (CHX e PVP-I nos veículos alcoólico, degermante e aquoso), sendo testadas 30 almotolias para cada solução. Os frascos foram tampados e armazenados em temperatura ambiente por 7 dias com agitação diária. Alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções anti-sépticas foram diariamente pipetadas e transferidas para os tubos contendo meio de cultura TSB. Os meios inoculados foram incubados em temperatura ambiente durante 21 dias. **Resultados:** Os resultados foram 100% de ausência de crescimento do contaminante-teste nas soluções,

demonstrando uma capacidade dos anti-sépticos em incorporar microrganismos na ordem de pelo menos 10^5 UFC/mL. **Conclusões:** Considerando que as almotolias apenas limpas carregam microrganismos vegetativos da água do enxágüe, na ordem de 10^2 UFC, os resultados desta investigação permitem a recomendação de que a limpeza como procedimento mínimo no processamento desses recipientes garante a segurança de sua utilização repetida para distribuição dos anti-sépticos testados – clorexidina e PVP-I.

Palavras-chave: Anti-séptico. Contaminação. Almotolia. Infecção hospitalar.

PADOVANI CM. Microbiological evaluation of different antiseptic povidone-iodine and chlorhexidine formulations after intentional contamination of the solution recipients [dissertation]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2008.

ABSTRACT

Background: Literature reports contaminated antiseptic solutions as infection causes in healthcare settings. Small disposable antiseptic containers, which allow fast and individual use, are broadly preferred. However, the use of nondisposable containers is the most common practice in Brazilian health-care institutions. The best techniques for processing these no-disposable antiseptic solution containers are not yet known. They have been frequently discussed in healthcare settings, but without scientific basis. **Aims:** the present study aimed to evaluate the survival rate of microorganisms within different antiseptic formulations – povidone-iodine (PVPI-I) and chlorhexidine (CHX) – after intentional contamination with *Serratia marcescens* and to establish the minimum care needed to ensure the sterilization of nondisposable antiseptic solution containers. **Methods:** a laboratory study was performed with 180 antiseptic disposable containers, which were contaminated with *Serratia marcescens* [1×10^5 UFC/mL]. In each container were added 150 mL of one of six different antiseptic solutions (povidone-iodine and chlorhexidine in aqueous, detergent, and alcoholic formulations), totaling 30 containers with each formulation. The recipients were closed and stored at room temperature during seven days and shaken daily. One milliliter of each antiseptic solution was collected each day and inoculated into tryptic soy broth (TSB) cultures and incubated at room temperature for 21 days. **Results:** the antiseptic cultures were evaluated to be 100% negative to *Serratia marcescens* in all of the nondisposable containers. **Conclusion:** These results suggested that antiseptic solutions CHX and PVPI-I were able to inactivate microorganisms [1×10^5 UFC/mL]. Since cleaned antiseptic recipients have around 10^2 UFC coming from sink water, it can be supposed that cleansing is a safe minimum procedure to ensure

reuse of containers for distribution of CHX and PVIP-I solutions in aqueous, detergent, and alcoholic formulations.

Key Words: Antiseptic, Contamination, Cross infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ilustração da pele, demonstrando a localização da microbiota transitória e residente.....	20
Figura 2 -	Ordem decrescente de resistência dos microrganismos aos germicidas.....	31
Figura 3 -	Tubos contendo 7 mL de meio TSB.....	42
Figura 4 -	Ilustração da almotolia com 150 mL de anti-séptico.....	43
Figura 5 -	Transferência dos anti-sépticos para os meios de cultura - Grupo I.....	45
Figura 6 -	Transferência dos anti-sépticos para os meios de cultura - Grupo II.....	45
Figura 7 -	Fluxograma dos experimentos com as soluções de CHX e PVP-I.....	46
Figura 8 -	Meios límpidos após 21 dias de incubação.....	48
Figura 9 -	Controle positivo com turvação e coloração após 24 e 48 horas de incubação, respectivamente.....	49
Figura 10 -	Placa do controle positivo mostrando incontáveis unidades formadoras de colônias de <i>S. marcescens</i>	49
Quadro 1 -	Mecanismos e Espectro de atividade da clorexidina e iodóforos.....	25
Quadro 2 -	Fatores que influenciam a atividade dos germicidas.....	33
Quadro 3 -	CrITÉRIOS de avaliação da eficácia de anti- sépticos.....	34
Quadro 4 -	Concentração Inibitória Mínima dos anti-sépticos.....	36
Quadro 5 -	Recuperação da <i>Serratia marcescens</i> nos controles positivos do Grupo I e Grupo II.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Unidade de Medida Micrograma (milionésimo do grama)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APIC	<i>Association for Professional in Infection Control</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração Bacteriana Mínima
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CHX	Clorexidina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bacteriana Mínima
DNA	Desoxiribonucleic-Acid
EEUSP	Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
ETO	Óxido de etileno
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEPA	<i>High efficiency particulate air</i>
mL	Unidade de medida Mililitro (milionésimo do litro)
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PVP-I	Polivinilpirrolidona –iodo
TSB	Tryptone Soy Broth
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Anti-sepsia: conceito, histórico e aspectos legais.....	17
1.2 Microbiota da pele.....	19
1.3 Os iodóforos.....	22
1.4 A Clorexidina.....	23
1.5 Utilização dos anti-sépticos na prática assistencial.....	26
1.6 Contaminação de anti-sépticos.....	30
1.7 Testes microbiológicos de anti-sépticos.....	34
 2. OBJETIVOS.....	 38
 3. MATERIAL E MÉTODO.....	 39
3.1 Tipo de estudo.....	39
3.2 Local do estudo.....	39
3.3 Material e Tamanho da amostra.....	39
3.3.1 Agentes anti-sépticos testados.....	39
3.3.2 Microrganismo teste.....	40
3.3.3 Inóculo.....	41
3.3.4 Meio de cultura.....	41
3.3.5 Almotolias.....	42
3.3.6 Capela de fluxo laminar.....	43
3.3.7 Tamanho da amostra.....	43
3.4 Planejamento experimental.....	44
 4. RESULTADOS.....	 48
 5. DISCUSSÃO.....	 52
 6. CONCLUSÕES.....	 58

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
--	-----------

APÊNDICES

Apêndice A - Controle de Agitação das Almotolias.....	64
Apêndice B - Fluxograma dos experimentos programados para a Fase 2.....	65
Apêndice C - Metodologia de trabalho.....	66

ANEXO

Anexo A - Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano segundo a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 – MS.....	67
Anexo B - Tratamento de água realizado pela Sabesp.....	68
Anexo C - Distribuição de água preconizado pela Sabesp.....	69

1. INTRODUÇÃO

Entende-se como anti-sepsia o processo de eliminação ou inibição do crescimento dos microrganismos na pele e mucosas, por meio de anti-sépticos. Essas formulações têm como característica singular a hipoalergenicidade e a baixa causticidade (CDC, 2002).

As tentativas de utilização desses agentes para prevenir as infecções e reduzir suas complicações datam da época de Hipócrates (Cerqueira, 1997). Atualmente, as principais utilizações dos anti-sépticos nas instituições de saúde são: na higienização das mãos, no preparo cirúrgico da pele do paciente, na degermação das mãos e antebraço da equipe cirúrgica, e em alguns procedimentos invasivos como punções venosas centrais e arteriais, cateterismos vasculares e vesicais e outros onde ocorre o rompimento das barreiras normais de defesa do indivíduo.

Os relatos encontrados na literatura sobre anti-sépticos que sofreram contaminação microbiológica causam preocupação nos profissionais da área de controle de infecção relacionada à assistência à saúde, pois essas contaminações têm sido causa de surtos de infecção e colonização de pacientes internados. Outro motivo de preocupação é a possível redução da susceptibilidade das bactérias aos agentes anti-sépticos, que não estão sendo capazes de conter a reprodução microbiana nesses meios.

Entretanto, as concentrações atualmente utilizadas dos agentes anti-sépticos na prática dos serviços de assistência à saúde são substancialmente maiores que as concentrações inibitória e bactericida mínima das bactérias que tiveram capacidade de crescer nas soluções anti-sépticas. A contaminação dessas soluções não está necessariamente associada à redução de susceptibilidade, mas também a causas exógenas. Fatores como armazenamento inadequado do anti-séptico, recipientes (almotolias) sem vedação, falhas na estabilidade da formulação do produto podem contribuir, pelo menos em parte, para a aparente contaminação encontrada na prática.

Em relação aos cuidados para a conservação das propriedades dos anti-sépticos, a proteção dos recipientes contra agentes físicos (exposição à

luz solar e temperaturas elevadas) é uma forte recomendação dos fabricantes por se tratar de soluções químicas, assim como a preferência por almotolias descartáveis, de pequeno volume, que possibilitam a individualização do uso e o consumo rápido do produto. No entanto, constata-se que a utilização de almotolias coletivas e reprocessáveis, para veiculação de soluções anti-sépticas, tem sido a prática mais comum nas instituições de saúde do país. É escassa a literatura nacional sobre contaminação dessas soluções. O tempo de troca do conteúdo também não está embasado em dados científicos, assim como o cuidado que deve ser dispensado a essas almotolias no momento do processamento.

Devido à constatação de casos reportados de contaminação de anti-sépticos, a forma adequada do processamento das almotolias merece ser discutida. Não há trabalhos científicos publicados sobre a diferença de contaminação destas soluções se a almotolia for apenas submetida à limpeza, à desinfecção ou até à esterilização, tema esse que esta pesquisa propõe estudar. Caso seja comprovada a segurança do processamento desses recipientes somente por meio da limpeza, esta investigação oferecerá contribuições para uma prática racional e econômica.

1.1 Anti-sepsia: conceito, histórico e aspectos legais

O entendimento e diferenciação das definições dos germicidas são importantes para a compreensão da aplicação desses agentes na assistência à saúde. De acordo com Weber, Rutala e Bennett (2006), os germicidas são agentes biocidas que inativam microrganismos e incluem anti-sépticos, desinfetantes e preservativos. Os primeiros são substâncias antimicrobianas de aplicação na pele e mucosas para redução da contagem microbiana. Em uma definição mais ampla, Graziano, Silvia e Bianchi (2000) descrevem os anti-sépticos como “substâncias providas de ação letal ou inibitória da reprodução microbiana, de baixa causticidade e hipoalergênicas, destinadas à aplicação na pele e mucosas íntegras”. Ainda de acordo com Weber, Rutala e Bennett (2006), os desinfetantes são substâncias de aplicação em objetos inanimados para destruição de microrganismos indesejáveis, sem necessariamente agir sobre os esporos bacterianos. Finalmente, os preservativos são incorporados a medicações ou fluidos, para prevenir contaminação microbiana das soluções.

Ao longo da história, os anti-sépticos passaram por muitas tentativas de utilização na prática da saúde, de modo a evitar-se o aparecimento ou disseminações de infecções. Agentes antimicrobianos anti-sépticos têm sido usados desde os tempos faraônicos na forma de produtos naturais ou químicos (Crabtree, Pelletier, Pruett, 2001). A história dos anti-sépticos confunde-se com a história do tratamento de feridas. O álcool sob a forma de vinho foi empregado há cerca de 2000 anos como agente antimicrobiano (Russel, 2004). Nos séculos XVIII e XIX, com o avanço da química, houve a descoberta de compostos à base de iodo e cloro, os quais foram usados para a limpeza da pele e de materiais. Desde 1920 já se usavam as soluções de hipoclorito, e as soluções contendo iodo foram utilizadas entre 1861 e 1865, durante a guerra civil americana. Já os anti-sépticos metálicos só passaram a ser usados no final do século XIX. Como as bactérias desenvolviam rápida resistência aos minerais inorgânicos, por volta de 1920, surgiram os mercúrios orgânicos, sendo o mercúrio cromo um dos mais conhecidos. No final do século XIX e início do século XX foram introduzidos

os fenóis. A partir deste século, surgiram várias soluções de uso tópico empregadas no tratamento das feridas. Com o avanço científico surgiram novos anti-sépticos como os compostos à base de quaternários de amônio, povidona e clorexidina (Cerqueira, 1997).

Ignaz Semmelweis e Joseph Lister são considerados os precursores da moderna anti-sepsia, pois desenvolveram princípios e técnicas anti-sépticas antes da ciência da bacteriologia ser desenvolvida (Crabtree, Pelletier, Pruett, 2001).

Para Mody et al. (2001), a prática de utilização dos anti-sépticos também varia em diferentes países. Formulações com álcool são predominantes na Europa. Já nos países anglo-americanos, predomina a utilização de antimicrobianos alcoólicos contendo 2 ou 4% de clorexidina e anti-sépticos à base de iodo. Atualmente, há várias soluções anti-sépticas disponíveis no mercado, em diferentes formulações: aquosas, alcoólicas e detergentes. As formulações aquosas são indicadas para anti-sepsia de mucosas e as alcoólicas são utilizadas na pele íntegra. Por fim, as formulações detergentes estão indicadas para a remoção de detritos e impurezas da superfície da pele, ao mesmo tempo em que eliminam e inibem o crescimento microbiano. Estas últimas formulações têm sido utilizadas tanto para higienização e degermação das mãos/antebraços dos profissionais da saúde, quanto para pré-degermação cirúrgica da pele do paciente, seguida da utilização do mesmo princípio ativo em veículo alcoólico (CDC, 1999).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos EUA (2002), os anti-sépticos podem ser classificados como agentes bactericidas, devido à sua capacidade de destruição dos microrganismos, ou bacteriostáticos, quando apenas inibem o crescimento desses microrganismos. Muitas vezes, a diferença entre essas duas classificações está no tempo de exposição, número inicial de microrganismos presentes no local de aplicação e na concentração do agente. O critério para escolha do tipo de anti-séptico deve basear-se no seu índice terapêutico, ou seja, na relação entre a concentração eficaz contra os microrganismos e os efeitos

deletérios sobre os tecidos vivos, com ênfase nos riscos de irritação local (Graziano, Silvia e Bianchi, 2000).

O órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) publicou em 1994 uma monografia sobre anti-sépticos, em que há uma vasta lista desses produtos normatizados, bem como sua indicação e mecanismo de ação, dentre outras informações. São eles: álcool, clorexidina (CHX), cloroxilenol, hexaclorofeno, iodo e iodóforos, compostos de quaternário de amônia, oxícloroseno e triclosan. Em 2005, esse mesmo órgão publicou um memorando onde fez algumas revisões acerca do uso de anti-sépticos, com ênfase na questão do uso indevido desses produtos para a população em geral.

A utilização de anti-séptico no Brasil não está especificamente normatizada, de forma que não há uma regulamentação própria para o uso desses agentes em âmbito nacional. Como referência à utilização de tais produtos, encontramos a Portaria nº 2616 do Ministério da Saúde de 1998, que estabelece as diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares. O Anexo V dessa portaria - Recomendações quanto à utilização de Anti-sépticos, Desinfetantes e Esterilizantes – faz apenas referência à Portaria nº 15 do Ministério da Saúde de 1988, que determina o registro de produtos domissanitários, sem orientações específicas para o uso de anti-sépticos. O Ministério da Saúde exige que esses produtos possuam registro, de forma que os anti-sépticos comercialmente disponíveis e recomendados são as soluções alcoólicas (principalmente álcool etílico 70%), os compostos à base de clorexidina, as soluções iodadas, o paraclorometaxilenol e o triclosan, sendo os três primeiros os mais utilizados (Molina, 2004). As formulações atualmente não recomendadas para anti-sepsia são mercuriais orgânicos, acetona, quaternário de amônio, líquido de Dakin, éter e clorofórmio (Portaria nº 2616 do Ministério da Saúde de 1998).

1.2 Microbiota da pele

O conhecimento da microbiota normal da pele é essencial para se entender os diferentes enfoques da anti-sepsia. A pele humana é colonizada

por diversos microrganismos; diferentes áreas do corpo têm variações quanto à contagem de bactérias. A contagem total de microrganismos das mãos varia de 3.9×10^4 a 4.6×10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) (CDC, 2002; Larson et al, 2003).

Os microrganismos vivem na superfície cutânea, especialmente na camada córnea, e também no interior das glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos. Em 1938, as bactérias que colonizam a pele humana foram divididas em duas categorias: transitória e residente (CDC, 2002; Cerqueira, 1997). Há autores que consideram ainda uma terceira classificação, a da flora temporariamente residente (Graziano, Silvia e Bianchi, 2000). A figura 1 ilustra a localização da microbiota transitória e residente na pele.

Figura 1- Ilustração da pele, demonstrando a localização da microbiota transitória e residente

A microbiota transitória é constituída de microrganismos adquiridos por contato direto com o meio ambiente. É também conhecida como microbiota de contaminação ou exógena. Como fica frouxamente aderida sobre as camadas mais superficiais da pele, é facilmente transferida para outros indivíduos e fômites e é removida pelo suor ou eliminada pelos mecanismos anti-infecciosos locais e pelos procedimentos de higienização

das mãos. Sobrevivem por um curto período de tempo, cerca de 48 horas. Apesar desse tempo curto de sobrevivência, essa microbiota está representada pelos microrganismos que geralmente causam as infecções relacionadas à assistência à saúde. Normalmente tais microrganismos são adquiridos pelos profissionais da saúde pelo contato direto com pacientes ou contato com superfícies contaminadas (CDC, 2002; Graziano, Silvia e Bianchi, 2000).

Já a microbiota residente, também chamada de microbiota de colonização ou endógena, é composta por microrganismos que vivem e se multiplicam nas camadas mais profundas da pele, glândulas sebáceas, folículos pilosos, profundidade das feridas, trajetos fistulosos. Esses microrganismos multiplicam-se em perfeito equilíbrio com os mecanismos anti-infecciosos locais do hospedeiro. Constitui-se, portanto, a população estável que só pode ser removida parcial e temporariamente pela descamação celular, natural ou forçada e por procedimentos de degermação com o uso de anti-séptico. Adicionalmente, a microbiota residente está menos associada à ocorrência de infecções hospitalares. Apesar de oferecer baixa virulência, pode ser responsável por infecções graves nos pacientes imunodeprimidos submetidos a procedimentos invasivos que permitam a penetração destes microrganismos na corrente sanguínea ou nos tecidos (CDC, 2002; Larson, 1993).

A microbiota temporariamente residente pode ser definida como a de microrganismos normalmente transitórios da pele ou mucosa, mas que podem comportar-se temporariamente como residentes por períodos que variam de dias até semanas. Profissionais da saúde podem apresentar uma microbiota diferenciada nas mãos e cavidade orofaríngea em função da microbiota temporariamente residente (Graziano, Silvia e Bianchi, 2000).

Em pacientes hospitalizados, as bactérias Gram-negativas e a microbiota fecal são encontradas com maior frequência na pele. Há estudos demonstrando uma diferença quantitativa e qualitativa na resistência aos antimicrobianos na microbiota da pele de pacientes hospitalizados em relação à de adultos saudáveis, sendo que naqueles pacientes há presença de uma maior quantidade de microrganismos, inclusive os resistentes aos antibióticos (Larson, 2003; Larson, Aiello, 2003).

De acordo com Crabtree, Pelletier, Pruett (2001), a utilização de anti-sépticos não deve interferir na proteção funcional da pele, dada a importância desse órgão como barreira contra infecção. Adicionalmente, a remoção excessiva da camada lipídica da pele pode resultar em lesões significativas para profissionais da saúde. Esse autor coloca ainda que estudos fisiológicos devem ser aplicados aos anti-sépticos, em adição às avaliações de eficácia, inativação, toxicidade e absorção.

1.3 Os iodóforos

O iodo é um agente químico não metálico, pouco solúvel em água, porém solúvel em álcool, glicerol, óleos, benzeno e clorofórmio, descoberto em 1812 na França (Gottardi, 2001; Rutala, 1996). Já em 1829 há relato de seu uso na área da saúde, mas o iodo foi reconhecido oficialmente em 1830 pela Farmacopéia dos Estados Unidos. O primeiro artigo científico sobre a eficácia microbicida desse agente foi publicado em 1874, em que houve um experimento de composto de iodo contra esporos de *Bacillus anthrax*. A partir de então, a literatura sobre o uso de compostos à base de iodo foi largamente expandida (Gottardi, 2001).

Seu poder germicida é evidenciado pela penetração do iodo na parede celular das bactérias, provocando alterações no ácido nucléico e na síntese protéica. Possui ação efetiva e imediata contra um amplo espectro de microrganismos, como bactérias e vírus entéricos, além de ter atividade micobactericida, fungicida e tricomonicida. Nas concentrações praticadas, os iodóforos usualmente têm ação esporicida limitada (Gottardi, 2001; CDC, 2002; Rutala, 2006).

Para contornar o problema da insolubilidade do iodo na água, foram desenvolvidos os **iodóforos**, que são combinações de iodo com um agente solubilizante e transportador. O PVP (polivinilpirrolidona) é o polímero mais utilizado para dissolver o iodo, formando o PVP-I (polivinilpirrolidona –iodo), que é o iodóforo mais conhecido. Dentre os outros polímeros menos

utilizados, estão o polieterglicol, polivinilálcool, álcool poliacrílico, poliamidas e polissacarídeos (Gottardi, 2001). Nesse compostos, o iodo livre (que é o responsável pela ligação com os microrganismos) é liberado lentamente e sua ação microbida decorre da penetração na parede celular, oxidação e substituição do conteúdo microbiano. O PVP-I atua carreando moléculas de iodo que são liberadas gradualmente em baixas concentrações, reduzindo assim sua toxicidade. Mesmo que a atividade germicida seja mantida, os iodóforos são considerados menos ativos contra certos fungos e esporos e mais susceptíveis à contaminação (CDC, 2002).

A maioria dessas preparações se apresenta na concentração de 7,5% a 10% de povidona iodo. Formulações com concentrações menores também têm uma boa atividade antimicrobiana porque a diluição pode aumentar a concentração de iodo livre. Entretanto, a concentração aumentada de iodo livre pode aumentar a irritação na pele (CDC, 2002).

Embora as soluções iodadas tenham sido utilizadas por 150 anos como anti-séptico, seu uso foi limitado por muitos anos antes da combinação com PVP, por ocasionar queimaduras, irritações e hipersensibilidade na pele e mucosas (Mc Donnell, Russel, 1999). Os iodóforos trouxeram uma menor toxicidade aos compostos, e estudos já demonstraram que não há possibilidade de desordem na função da glândula tireóide. Os iodóforos também apresentam a vantagem de ter efeito residual (cerca de uma hora) e não manchar permanentemente os tecidos (Gottardi, 2001). Entretanto, têm atividade reduzida na presença de matéria orgânica (Rutala, 2006).

As apresentações dos iodóforos no mercado brasileiro são: PVP-I a 10% (1% de iodo ativo), em veículo degermante, alcoólico e aquoso.

1.4 A Clorexidina

A clorexidina (CHX) é uma biguanida que foi sintetizada em 1950, na Inglaterra, por ocasião das pesquisas conduzidas no combate à malária. Em 1953, o cloridrato de clorexidina foi desenvolvido e introduzido como anti-séptico, sendo que sua introdução nos Estados Unidos deu-se em 1970. Logo se destacou por suas propriedades altamente bactericidas somadas à

baixa toxicidade e afinidade química com as estruturas da pele e mucosa. Essas características levaram ao desenvolvimento da clorexidina como um importante anti-séptico, inclusive na área odontológica (Denton, 2001).

Atualmente, o gluconato de clorexidina é a preparação mais utilizada por apresentar maior solubilidade. As soluções e os sais de clorexidina são incolores, inodoros e básicos. Sua atividade microbicida é pH dependente, sendo que o nível ótimo é de 5.5 a 7.0, correspondendo ao pH dos tecidos e superfície do corpo (Denton, 2001). Sua ação é por destruição da membrana celular e precipitação dos componentes internos da célula bacteriana.

Apresenta excelente atividade antimicrobiana, com início de ação praticamente imediata (cerca de 15 segundos), e efeito residual de aproximadamente 6 a 8 horas. Além disso, apresenta um importante efeito acumulativo e sua atividade não é significativamente afetada pela presença de matéria orgânica (CDC, 2002). Esse anti-séptico tem mostrado boa atividade contra bactérias Gram positivas e menor atividade contra bactérias Gram negativas e fungos. A infectividade dos vírus lipofílicos (influenza vírus, herpes vírus, HIV, HBV) é rapidamente inativada pela clorexidina. Entretanto, soluções aquosas não apresentam atividade significativa contra vírus não-lipofílicos, como vírus entéricos, da poliomielite e papiloma vírus (Denton, 2001; CDC, 2002; Rutala, 2006). Adicionalmente, estudos demonstraram que as soluções de clorexidina não afetaram a viabilidade de esporos de *Bacillus* nas concentrações usuais (Mc Donnell, Russel, 1999). Já para Denton (2001), pode-se observar atividade esporicida em temperaturas elevadas. Este autor coloca ainda que a delimitação exata do espectro de ação da clorexidina é dificultada pela grande diversidade de metodologias empregadas nas pesquisas, que variam entre espécies isoladas na clínica, cepas cultivadas em laboratórios e as obtidas das coleções padronizadas de cultivo. Embora existam numerosas publicações sobre as propriedades bacteriostáticas e bactericidas da clorexidina contra microrganismos particulares, os métodos usados variam e a comparação dos achados torna-se difícil.

O espectro de ação da CHX está resumido no quadro 1, sendo comparado com o espectro do PVP-I.

Quadro 1- Mecanismos e Espectro de atividade da clorexidina e iodóforos

Agente	Mecanismo de ação	Bactérias Gram +	Bactérias Gram -	Mtb	Fungos	Vírus	Velocidade de ação	Atividade residual
Clorexidina	Ruptura da membrana celular	E	B	R	I	B	B	E
iodóforos	Oxidação dos componentes celulares	E	B	B	B	B	R	B

Abreviações: E, excelente; B, boa; R, regular; I, intermediário; N, nenhum; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*.

Extraído: *Guideline for Prevention of Surgical Site Infection*, CDC, 1999.

A clorexidina tem sido amplamente utilizada em todo o mundo por mais de 30 anos. Durante esse período, os dados reportados de reações adversas são raros. Extensos estudos envolvendo experimentos animais e voluntários humanos, bem como estudos observacionais em pacientes hospitalizados têm sido conduzidos para determinar a natureza e a probabilidade de possíveis reações associadas às muitas aplicações da clorexidina nos tecidos vivos. A abrangência desses estudos vai desde a utilização destes anti-sépticos em pele intacta até feridas traumáticas e cirúrgicas, passando inclusive pela utilização em membranas mucosas delicadas, como a bexiga. Até agora não há evidência de carcinogenicidade e a incidência de irritação da pele e hipersensibilidade é muito pequena quando da utilização das concentrações recomendadas (Denton, 2001; CDC, 2002). Também apresenta pouca absorção pela pele. Porém, há relato de toxicidade em tecidos nervosos e sua utilização no cérebro e meninges, assim como em olhos e ouvidos, deve ser evitada (CDC, 2002). De acordo com Denton (2001), a toxicidade ocular mostrou não haver diferença significativa do grupo controle, em concentrações inferiores a 1%.

Como a clorexidina é uma molécula catiônica, sua atividade pode ser reduzida por vários ânions inorgânicos e agentes emulsificantes aniônicos, dentre eles o PVP-I (Denton, 2001). Os fabricantes desses produtos e as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) recomendam a concordância do princípio ativo na mesma superfície, de forma que há uma contra-indicação da utilização de PVP-I degermante seguido de CHX

alcoólica ou vice-versa. Essa recomendação está refutada nos estudos experimentais de Langgartner et al.(2004), onde a combinação dos dois princípios não evidenciou perda das propriedades biocidas desses agentes.

A natureza e a qualidade dos recipientes que armazenam a clorexidina são importantes. Vidro, polipropileno e polietileno de alta-densidade são os materiais mais indicados. Polietileno de baixa densidade e outros materiais podem causar adsorção excessiva e interagir com o anti-séptico (Denton, 2001).

As apresentações disponíveis no Brasil são: a) solução degermante, contendo gluconato de clorexidina a 2 ou 4%, contendo ainda 4% de álcool etílico; b) solução alcoólica, contendo gluconato de clorexidina a 0,5% em veículo hidroalcoólico; c) solução aquosa a 0,2%, específica para usos de gineco-obstetrícia; e d) solução dentifrícia, contendo 0,012% a 0,025%, de gluconato de clorexidina, para uso odontológico (Molina, 2003).

1.5 Utilização dos anti-sépticos na prática assistencial

A utilização de agentes anti-sépticos é vasta, inclusive em outras áreas, que não a da saúde. Recentemente vem ocorrendo um aumento do consumo de anti-sépticos pela população em geral, principalmente por meio de cosméticos e produtos de higiene pessoal. No entanto, os benefícios dessa utilização ainda não estão claros e precisam ser mais bem avaliados (FDA, 2005; Larson et al., 2003; Larson, Aiello, 2003).

Na assistência à saúde, as principais utilizações dos agentes anti-sépticos ocorrem nas seguintes situações: higienização das mãos, preparo cirúrgico da pele do paciente e equipe cirúrgica, e em alguns procedimentos invasivos como punções venosas centrais e arteriais, cateterismos vasculares e vesicais e outros onde ocorre o rompimento das barreiras normais de defesa do indivíduo. Há ainda a utilização desses agentes na higienização oral de pacientes sob ventilação mecânica e em situações controversas como tratamentos de queimadura e ferida infectada (Denton, 2001). A aplicação de anti-sépticos está recomendada em pele e mucosas íntegras, não sendo recomendada nas áreas com solução de continuidade

devido a citotoxicidade dos princípios ativos para as células em neoformação do hospedeiro, em processo de cicatrização das feridas (Molina, 2004).

O FDA (1994) regulamenta o uso de anti-sépticos na área da saúde para preparo pré-operatório da pele, degermação pré-operatória das mãos e antebraços da equipe cirúrgica e higienização das mãos dos profissionais da saúde. As utilizações dos anti-sépticos estão indicadas nas seguintes situações, em graus variados de evidência:

- Banho pré-operatório: vários estudos reportados no último guia de prevenção de sítio cirúrgico do CDC (1999) apontam que esta prática reduz a contagem de colônias da microbiota da pele, apesar de essa diminuição não estar relacionada com a redução das taxas de infecção cirúrgica. Ainda assim, o banho pré-operatório com anti-séptico está recomendado, principalmente para cirurgias de grande porte e para aquelas onde ocorre colocação de próteses. A recomendação de banho pré-operatório recebe categorização IB * pelo CDC.

- Preparo cirúrgico da pele do paciente: a degermação e anti-sepsia no local da incisão cirúrgica é fortemente recomendada como fator de prevenção de infecção cirúrgica (categoria IB*). A degermação compreende a remoção de detritos e impurezas na superfície da pele, seguida da utilização do mesmo princípio ativo em veículo alcoólico (CDC 1999).

* Categorias das recomendações (CDC, 2002):

Categoria IA: Fortemente recomendada para implementação e fortemente embasada em estudos experimentais, clínicos ou observacionais bem delineados.

Categoria IB: Fortemente recomendada para implementação e embasada por alguns estudos experimentais, clínicos ou observacionais bem delineados e em forte base racional.

Categoria IC: Implementação exigida, conforme regulamentação ou padrão mandatório federal ou estadual.

Categoria II: Sugerida para implementação e apoiada em estudos clínicos e epidemiológicos sugestivos ou em base racional.

Nenhuma recomendação: Questão não resolvida. Práticas para as quais há evidência insuficiente ou inexiste qualquer consenso acerca da eficácia.

Essa indicação é especialmente importante considerando que a grande maioria das infecções de sítio cirúrgico é causada pela microbiota endógena do paciente, ou seja, pelos microrganismos da pele, membrana mucosa ou vísceras ocas (Graziano, Silvia e Bianchi, 2000; Crabtree, Pelletier, Pruett, 2001).

- Degermação das mãos e antebraços da equipe cirúrgica: essa prática também é fortemente recomendada (categoria IB*) para os profissionais que têm contato direto com o sítio cirúrgico e instrumentais estéreis, haja vista que há microperfurações na superfície das luvas, muitas vezes não percebidas pela equipe cirúrgica. Os principais agentes utilizados nos Estados Unidos e no Brasil são a clorexidina e o PVP-I, enquanto que na Europa, o álcool é considerado o padrão-ouro para a degermação cirúrgica das mãos (CDC 1999).

- Higienização das mãos: estudos demonstraram redução das taxas de infecção relacionada à assistência em algumas unidades de terapia intensiva (CDC, 2002). Estas preparações são recomendadas em alguns procedimentos invasivos, em casos de surto e situações de contato com microrganismos multi-resistentes (ANVISA, 2005). De acordo com Soares (2002), a eficácia do sabão e de anti-sépticos na remoção de microrganismos da microbiota transitória das mãos parece estar relacionada com o grau de contaminação da pele. Assim, nas mãos contaminadas com até 10^3 UFC de bactérias, a eficácia do sabão líquido pode ser similar à dos anti-sépticos. Entretanto, nas mãos altamente contaminadas, os anti-sépticos parecem apresentar eficácia superior.

- Inserção de cateteres vasculares, vesicais e outros procedimentos invasivos: o uso de anti-séptico apropriado no local da inserção de um cateter central e durante sua manipulação é fortemente recomendado (categoria IB) para a prevenção de infecção de corrente sanguínea (CDC, 2002). O mesmo acontece na recomendação para prevenção de infecção do trato urinário, antes da inserção de um cateter vesical. Há outros

procedimentos invasivos, em que a utilização de agentes anti-sépticos está baseada em suporte científico, suporte prático ou razões teóricas.

Nas recomendações sobre prevenção de infecção de sítio cirúrgico do CDC (1999) é citado que nenhum agente anti-séptico é ideal para todas as situações. A seleção do anti-séptico deve considerar algumas propriedades e requisitos: ter amplo espectro de ação, ação rápida, efeito residual e cumulativo, baixa toxicidade, baixa inativação por matéria orgânica, ser estável e não corrosivo, ter odor agradável e boa aceitação pelo usuário, custo acessível e disponibilidade no mercado local.

Discorrendo ainda sobre a utilização dos anti-sépticos na prática assistencial, a utilização de recipientes de uso coletivo e reprocessáveis para veiculação dessas soluções tem sido a prática mais comum nas instituições de saúde no Brasil, embora haja a disponibilidade comercial de almotolias descartáveis para um único paciente.

Uma vez que as almotolias são reutilizadas, há que se estabelecer uma forma segura de reprocessá-las. O reprocessamento de todo produto médico-odonto-hospitalar deve levar em consideração seu potencial de risco na transmissão de agentes infecciosos. A recomendação de Spaulding (1968) vem sendo adotada pelos profissionais para determinar os processos a que serão submetidos os materiais nas instituições de saúde. A proposta é de que os itens críticos (aqueles que entram em contato com tecidos estéreis ou com materiais que entram em contato com tecidos estéreis) sejam esterilizados. Já os itens semi-críticos (aqueles que entram em contato com membranas mucosas colonizadas) devem ser submetidos minimamente à desinfecção de alto nível. E os itens não críticos (aqueles que entram em contato com pele intacta) devem ser submetidos à desinfecção intermediária ou de baixo nível, sendo que hoje já se admite apenas a limpeza como procedimento seguro na utilização desses últimos artigos (Rutala, 2006).

A inclusão das almotolias nesta classificação gera questionamentos, visto que são itens que não entram em contato direto com o paciente, porém não se pode admitir que estejam contaminados veiculando microrganismos.

Esses recipientes acondicionam soluções estéreis que serão utilizadas para atingir redução microbiana nas áreas propostas. A prática mais comum de reprocessamento desses itens em nosso meio é a esterilização a baixa temperatura ou a desinfecção química de alto nível, porém há serviços que realizam apenas a limpeza.

Considerando que essas soluções têm propriedades biocidas, os microrganismos eventualmente presentes nas almotolias não deveriam sobreviver nesse meio. Assim sendo, questiona-se: seria necessária a esterilização das almotolias onde os anti-sépticos são acondicionados? É a pergunta que esta investigação propõe responder.

1.6 Contaminação de anti-sépticos

Há relatos na literatura de anti-sépticos que sofreram contaminação microbiológica, principalmente por bacilos Gram negativos (Marrie, Costerton, 1981; Berckelman et al., 1981; Goetz, 1989; Anderson et al., 1990; Archibald, 1997; Vigeant, Loo, Bertrand, 1998; Bouallegue, Mzoughi, Weill, 2004; Gomes et al., 2008).

Muitos surtos hospitalares reportados na década de 80 tiveram suas fontes comprovadas por meio da contaminação de soluções à base de iodo. Berckelman et al. (1981) publicaram casos de pseudobacteremias por *Pseudomonas* spp encontradas em solução de povidine, responsáveis por casos falso-positivos de hemoculturas. Outro caso foi publicado por Goetz (1989), atribuindo a contaminação do PVP-I com *P. aeruginosa* como causa de infecções em pacientes dialíticos ambulatoriais. Anderson et al.(1990) reportaram sobrevida prolongada de *Pseudomonas cepacia* em soluções iodóforas comercializadas. A anti-sepsia em cateter umbilical com PVP-I foi relacionada a um surto de bacteremia por *Pseudomonas* spp em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (Bouallegue, Mzoughi, Weill, 2004).

Há também casos reportados de contaminação de soluções de clorexidina, principalmente por bacilos Gram negativos. Em menos de duas décadas após a sintetização deste anti-séptico, Burdon e Whitby (1967, citados por Marrie e Costerton, 1981) descreveram a contaminação de uma

solução de clorexidina por *Pseudomonas* spp. Marrie e Costerton (1981) também reportaram caso de sobrevivência prolongada de *Serratia marcescens* em soluções de clorexidina. Há ainda relatos de surtos de *Serratia marcescens*, tendo a clorexidina como fonte comprovada (Vigeant, Loo, Bertrand, 1998; Rutala, 2006).

De acordo com Jones (1999), as bactérias Gram negativas são intrinsecamente mais resistentes aos anti-sépticos que as Gram positivas devido à natureza de sua parede celular. Elas também exibem maior resistência quando presentes em biofilmes ou associadas a superfícies. Para Miyagi (2000), a maior resistência das bactérias Gram negativas parece estar relacionada a uma adaptação fisiológica em resposta à mudança no ambiente, principalmente com alterações na membrana externa das células.

Rutala (1996), baseando-se nos estudos preliminares de Spaulding, descreve que a ordem de resistência dos microrganismos aos germicidas segue uma hierarquia, que considera a classificação por categoria microbiológica. Esta descrição está ilustrada na Figura 2.

Figura 2 - Ordem decrescente de resistência dos microrganismos aos germicidas

É crescente a preocupação dos profissionais da área de controle de infecção relacionada à assistência à saúde em relação à redução da susceptibilidade das bactérias aos agentes anti-sépticos. Weber e Rutala (2006) levantam três questionamentos quanto ao possível desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos agentes desinfetantes/anti-sépticos: 1- O uso de desinfetantes/anti-sépticos pode causar resistência? 2- Bactérias resistentes aos antibióticos apresentam susceptibilidade alterada aos desinfetantes / anti-sépticos? 3- O uso desses germicidas precipitam o desenvolvimento da antibiótico-resistência? Esses autores mencionam a falta de evidências para responder a esses questionamentos, no entanto, pode ocorrer a redução da susceptibilidade ou tolerância dos microrganismos a concentrações inferiores às utilizadas na prática. Porém, para o CDC, mais estudos são necessários para elucidar se a redução da susceptibilidade aos anti-sépticos é epidemiologicamente significativa e se essa resistência pode influenciar a antibiótico-resistência e vice-versa (CDC, 2002).

De acordo com a Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica (2000), a resistência microbiológica é conceituada como a insusceptibilidade do microrganismo ao material testado (ex. antibióticos, anti-sépticos, preservativos) e ocorre quando a bactéria adquire genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antimicrobiano por mutação espontânea de DNA ou por transformação e transferência de plasmídeos.

Kossiakoff (1887), citado por Russel (2004), encontrou que as bactérias adquirem a faculdade de desenvolver resistência com o aumento gradual das doses de alguns agentes químicos. Russel (2004) pondera que alguns biocidas têm sido utilizados por mais de um século e a redução de susceptibilidade dos microrganismos aos biocidas não é um fenômeno novo. Esse autor também faz algumas considerações sobre o uso desnecessário de anti-sépticos, mencionando a recente explosão do uso de formulações anti-sépticas cosméticas e caseiras, o que poderia aumentar a possibilidade de resistência bacteriana. O anti-séptico mais utilizado nessas formulações de produtos de higiene é o triclosan, que apresenta relatos de indução de resistência (Larson, Aiello, 2003).

Para Spainhour (1998), a contaminação de soluções anti-sépticas não está necessariamente associada à redução de susceptibilidade, mas principalmente a cuidados inadequados que levam a falhas na estabilidade da formulação do produto e sua preservação.

O quadro 2 enumera alguns fatores que influenciam a atividade dos germicidas.

Quadro 2 - Fatores que influenciam a atividade dos germicidas.

Fator	Efeito
Concentração	Atividade aumentada em concentrações maiores
Tempo de contato	Atividade aumentada em períodos prolongados de contato
pH	Melhor performance com alcance do pH ótimo. Iodóforos: ácido Clorexidina: alcalino
Temperatura	Atividade aumentada em temperaturas maiores.
Matéria orgânica	Fluidos, sangue e sujidade podem diminuir significativamente a atividade germicida.
Categoria microbiológica	Ordem decrescente de resistência dos microrganismos aos germicidas (figura 2)
Inóculo	Quanto menor o inóculo, maior efetividade do germicida
Condição	Biofilmes dificultam a ação do germicida

Fonte: RUSSEL, A.D. Factors Influencing the Efficacy of Germicides, 2003.

Dentre as publicações sobre contaminação das soluções anti-sépticas, não foi identificada nenhuma que relacionasse tal contaminação ao tipo de reprocessamento dos frascos, o que demonstra a relevância deste estudo.

1.7 Testes microbiológicos de anti-sépticos

As metodologias para avaliação dos anti-sépticos consistem na realização de testes *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vivo* são realizados em condições práticas de uso, quer seja no preparo pré-operatório das mãos, no preparo pré-operatório do paciente ou na higienização das mãos.

De acordo com a Farmacopéia Americana (2007), para a categoria de produtos anti-sépticos, os testes de efetividade antimicrobiana devem obedecer aos seguintes critérios: redução de 2 log₁₀ da contagem inicial nas aplicações durante 14 dias e não aumento desta contagem em aplicações até 28 dias.

Já na proposta de verificação da eficácia microbiológica de anti-sépticos do FDA, os critérios de avaliação levam em consideração a primeira e décima utilizações. Estes critérios estão especificados no quadro 3.

Quadro 3 - Critérios de avaliação da eficácia de anti-sépticos.

Utilização	Redução bacteriana após a 1ª utilização	Redução bacteriana após a 10ª utilização
- Área da saúde Higienização das mãos de profissionais da saúde	2 log ₁₀ após 5 minutos	3 log ₁₀ após 5 minutos
- Área da saúde Preparo pré-operatório do paciente	2 log ₁₀ após 1 minuto	3 log ₁₀ após 1 minuto
- Área da saúde Preparo pré-operatório das mãos	2 log ₁₀ após 1 minuto	3 log ₁₀ após 1 minuto
-Área cosmética: Lavagem das mãos Banho	1 log ₁₀ na primeira utilização	-
Área de alimentação: Higienização das mãos para o preparo de alimento	1 log ₁₀ na primeira utilização	-

Fonte: FDA, 1994.

Em relação aos testes *in vitro*, os mesmos são realizados sob condições controladas para determinar:

- o espectro antimicrobiano do ingrediente ativo,
- a Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou Concentração Bacteriana Mínima (CBM), utilizando cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) *,
- o possível desenvolvimento de resistência,
- o tempo de morte microbiana.

Os principais testes *in vitro* são a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e da CBM (Concentração Bactericida Mínima). A CIM é conceituada como a menor concentração, expressa em mg/L (ou µg/mL), capaz de inibir o crescimento do microrganismo em um período de tempo definido. A CMB determina a menor concentração, expressa em mg/L (ou µg/mL), capaz de reduzir 99,9% (três logaritmos) do número inicial de microrganismo em um período de tempo definido (*European Society of Clinical Microbiology*, 2000). De acordo com o FDA (1994), ambos os métodos devem utilizar metodologia estabelecida pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) e todos os testes *in vitro* devem incluir linhagens de microrganismos da ATCC.

* Microrganismos-teste preconizados pelo FDA:

A) Bacilos Gram-Negativos: *Acinetobacter* spp; *Bacteroides fragilis*; *Haemophilus influenzae*; *Enterobacter* spp; *Escherichia coli* (ATCC 11229 e 25922); *Klebsiella* spp, incluindo *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442 e 27853); *Proteus mirabilis*; e *Serratia marcescens* (ATCC 14756).

B) Cocos Gram-Positivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e 29213); *Staphylococcus Coagulase Negativo*: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus saprophyticus*; *Micrococcus luteus* (ATCC 7468); *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Enterococcus faecium*, e *Streptococcus pneumoniae*.

C) Fungos: *Candida* spp e *Candida albicans*.

Penna, Mazzola e Martins (2001) avaliaram a CIM de produtos biocidas utilizados em hospitais, dentre eles a clorexidina 4% e o PVP-I 10% (aquoso, degermante e alcoólico), utilizando bactérias envolvidas em infecção hospitalar no Brasil. Os valores encontrados da CIM para *S. marcescens* estão ilustradas no quadro 4, sendo que este microrganismo foi comparado com um coco Gram positivo – *Staphylococcus aureus*.

Quadro 4 - Concentração Inibitória Mínima dos anti-sépticos.

Agente	Concentração	CIM			
		<i>S. marcescens</i> *		<i>S. aureus</i> **	
		mg/L	%	mg/L	%
Clorexidina	4%	141	0.0141	71	0.0071
PVP-I aquoso	10%	6250	0.625	6250	0.625
PVP-I degermante	10%	6250	0.625	6250	0.625
PVP-I alcoólico	10%	3125	0.3125	3125	0.3125

Extraído: Penna et al. (2001)

* obtidas de coleção do Instituto Adolfo Lutz - IAL 1478

** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Os achados de Penna, Mazzola e Martins (2001) confirmam que a CIM desses microrganismos testados é menor que as concentrações comercialmente disponíveis, sendo que a *Serratia marcescens* apresentou uma susceptibilidade menor à clorexidina, quando comparada ao *Staphylococcus aureus*.

A definição de espectro de atividade e resistência ao anti-séptico está freqüentemente baseada em resultados de testes *in vitro* ao invés de dados clínicos ou *in vivo*. Questões como interação da formulação, quando em contato com a pele, podem interferir significativamente na atividade do anti-séptico (Bruch, 1991). A presença de muco e a diluição por fluidos orgânicos podem diminuir a real concentração *in vivo* desses agentes (Russel, 2004; CDC, 2002; Koljalg, 2002).

Muitas das pesquisas revisadas confiam somente nos testes da determinação da CIM como indicador de adaptação ou resistência dos

microrganismos. Sabe-se que esse teste é um ponto de partida útil para investigação da atividade antimicrobiana dos biocidas, mas pode não ser confiável para apontar a redução da susceptibilidade que ocorre nas concentrações substancialmente maiores dos anti-sépticos em uso na prática (Russel, 2004). Por outro lado, Thomas et al. (2000), destacam que a concentração residual dos anti-sépticos, especialmente da clorexidina, pode induzir uma pressão seletiva para resistência, já que essa concentração é inferior à CIM de algumas bactérias. Ainda assim, esta consideração não ficou clara em seus achados laboratoriais.

Nos ensaios microbiológicos com germicidas, um aspecto importante a ser considerado é a neutralização do possível efeito inibitório causado pela transferência do produto em estudo para o meio de cultura, resultando em teste falso negativo. Em outras palavras, o crescimento do microrganismo testado é inibido pela ação residual do germicida durante o cultivo e não pelo tratamento dado durante o teste (Sheikh, 1981). Esses produtos devem ser neutralizados após o tempo de exposição, o que pode ser realizado através de diluição, filtração ou inativação química. O método de inativação química é o mais utilizado. Os neutralizantes químicos indicados para testar iodóforos e clorexidina são tiosulfato de sódio e tween 80, respectivamente (Russel, 2003).

Isso posto, propôs-se nesta pesquisa buscar respostas que possam direcionar o procedimento mínimo indicado para o processamento dos recipientes que veiculam os anti-sépticos – CHX e PVP-I – quando não descartáveis, em busca de uma prática assistencial segura.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a sobrevivência dos microrganismos nas diferentes formulações dos anti-sépticos – CHX e PVPI-I – após contaminação intencional das almotolias com *Serratia marcescens*.
- Extrapolar os resultados laboratoriais para o cuidado mínimo a ser dispensado às almotolias de múltiplo uso para o envase dos anti-sépticos testados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A revisão bibliográfica foi realizada mediante consulta nas bases de dados eletrônicas nos portais US National Library of Medicine (www.pubmed.com) e Scielo (www.scielo.gov). Para o primeiro portal foram utilizados os seguintes descritores: “anti-infective agents” [MeSH], “cross infection” [MeSH], “equipment contamination” [MeSH], outbreak disease” [MeSH] com o operador booleano AND e “Pneumonia-Ventilator-Associated” [MeSH] com o operador booleano NOT. Esses mesmos descritores foram reordenados com busca dos termos “Chlorhexidine” e “Iodophors”. No segundo portal foram utilizados os descritores “anti-septic”, “contamination” e “outbreak”.

Dentre os artigos encontrados, nenhum tratava de contaminação do anti-séptico relacionada à forma de processamento de almotolias.

3.1 Tipo de estudo

Este estudo caracterizou-se como laboratorial experimental, em que todas as variáveis puderam ser controladas.

3.2 Local do estudo

Laboratório de Pesquisas Experimentais do Departamento de Enfermagem Médico-cirúrgica da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

3.3 Materiais e Tamanho da amostra

3.3.1 Agentes anti-sépticos testados

Foram testados os seguintes anti-sépticos:

- Solução aquosa de PVP-I 10% (Rioquímica ® *, lote 0705234).
- Solução degermante de PVP-I 10% (Rioquímica ®, lote 0705173).
- Solução alcoólica de PVP-I 10% (Rioquímica ®, lote 0705059).
- Solução degermante de clorexidina 2% (Rioquímica ®, lote 0704304).
- Solução alcoólica de clorexidina 0,5% (Rioquímica ®, lote 0705151).
- Solução aquosa de clorexidina 0,2% (Rioquímica ®, lote 0705105).

3.3.2 Microrganismo teste

Foi utilizada uma cepa de *S. marcescens* (ATCC 14756), adquirida da bacterioteca do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

A escolha de *Serratia marcescens* como microrganismo teste em nosso estudo deveu-se a dois motivos: primeiro, porque é um agente reconhecido como um importante patógeno causador de infecções nosocomiais (Marrie, Costerton, 1981; Archibald, 1997; Vigeant, Loo, Bertrand 1998; Soares, 2002). O segundo motivo da escolha desse microrganismo deu-se pelo fato da *Serratia marcescens* (ATCC 14756) ser recomendada pelo FDA para teste de espectro dos anti-sépticos. Adicionalmente, a bactéria do gênero *Serratia* é um microrganismo de fácil crescimento e identificação laboratorial. A produção peculiar de pigmento avermelhado facilita a diferenciação de contaminações acidentais que eventualmente possam ocorrer durante o experimento e dispensa a necessidade de colorações e microscopias.

* A escolha do fabricante foi pautada no critério de este distribuir ao mercado produtos em todo o território nacional. Os anti-sépticos foram recolhidos de uma distribuidora na cidade de São Paulo.

Soares (2002, p.723) destaca que:

A *Serratia marcescens* é atualmente um importante patógeno hospitalar oportunista que causa bacteremias, pneumonias, infecções do trato urinário e conjuntivites, entre outras infecções. As cepas hospitalares de *S. marcescens* freqüentemente apresentam resistência múltipla aos antibióticos, dificultando o tratamento, e provocam surtos que se iniciam geralmente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva. Nos hospitais, os principais reservatórios de *Serratia marcescens* incluem o trato gastrointestinal e a orofaringe de pacientes colonizados ou infectados e o ambiente. Soluções intravenosas, sabão não-medicamentoso, anti-séptico, desinfetante, respirador, cateteres uretral e intravenoso, contaminados com *S. marcescens* têm sido implicados como fontes de infecção em diferentes surtos hospitalares.

3.3.3 Inóculo

Uma amostra da cultura estoque da *S. marcescens* foi mantida em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) e subcultivada em meio trípico de soja (Tryptone Soy Broth – TSB). Após a confirmação de um tamanho do inóculo de 1×10^5 UFC/mL (turbidez equivalente na escala de Mac Farland), o mesmo foi utilizado para contaminar as almotolias. A inoculação nas almotolias foi de um volume de 1 mL, coletado por meio de micropipeta automática e distribuído em toda a parede interna da almotolia, com movimentos giratórios.

A suspensão da *S. marcescens* foi preparada pelo laboratório do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar da Santa Casa de São Paulo.

3.3.4 Meio de cultura

Foi utilizado meio de cultura trípico de soja (TSB Bacto™ -BD ®) liofilizado, pesado em balança de precisão, dissolvido em água destilada e aquecido para completa dissolução. Os meios foram ainda preparados com

adição de neutralizante específico para a clorexidina (tween 80 0,5% Vetec Química Fina LTDA ®) e para o PVP-I (sulfito de sódio 0,1% Synth ®).

O meio foi então distribuído nos tubos em um volume de sete mL e submetido à esterilização em autoclave gravitacional 121 °C durante 15 minutos, segundo recomendação do fabricante. Após resfriamento, os tubos foram identificados e mantidos em temperatura ambiente por 72 horas para controle de qualidade da esterilidade do meio de cultura. Os tubos foram armazenados sob refrigeração à temperatura de 2 a 8 °C.

Figura 3 -Tubos contendo 7 mL de meio TSB

3.3.5 Almotolias

As almotolias utilizadas eram de polietileno de alta densidade, com capacidade de 250 mL, primeiro uso e submetidas à limpeza e esterilização prévia em óxido de etileno (ETO) antes dos experimentos. Este procedimento foi adotado para certificar de que os experimentos começariam com um padrão uniforme, sem microrganismos algum nos recipientes, antes da contaminação desafio com microrganismos teste.

Figura 4 - Ilustração da almotolia com 150 mL de anti-séptico

3.3.6 Capela de fluxo laminar

Os procedimentos no laboratório foram controlados da contaminação ambiental, sendo realizados no interior de uma capela de fluxo laminar com filtro HEPA (*high efficiency particulate air*) para a filtragem de partículas maiores ou iguais a $0,3\ \mu\text{m}$. Este modelo de capela possui uma abertura frontal e 70% do ar é recirculado para o interior da capela, após passar pelo filtro HEPA, e 30% é exaurido para fora da capela após ter sido filtrado.

3.3.7 Tamanho da amostra

Foi consultado um profissional estatístico* que recomendou fazer um pré-teste e posterior cálculo do tamanho da amostra.

O pré-teste de contaminação das almotolias contou com seis amostras de almotolias para cada formulação (degermante / aquoso / alcoólico da CHX e do PVPI-I), totalizando 36 amostras.

* Dra. Eutália Aparecida Cândido de Araújo

Após leitura diária durante 21 dias, todos os meios permaneceram límpidos, acusando resultado negativo. Os controles positivos turvaram em 24 horas e os controles negativos permaneceram límpidos durante os mesmos 21 dias do experimento. Com esses resultados, o tamanho amostral ficou estabelecido em 30 recipientes para cada uma das seis formulações, totalizando 180 almotolias, com um poder amostral na ordem de 95%.

3.4 Planejamento experimental

As soluções dos anti-sépticos foram divididas em dois grupos, trabalhados em momentos diferentes:

- Grupo I: CHX
- Grupo II: PVP-I

Conforme mencionado, para certificação de que os experimentos iniciaram sem microrganismo algum, todas as almotolias foram submetidas a limpeza e esterilização prévia em óxido de etileno (ETO).

Em um primeiro momento, as 90 almotolias foram contaminadas intencionalmente em laboratório com 1 mL de suspensão de 10^5 UFC/mL de *S. marcescens*. Nas almotolias contaminadas, as três diferentes formulações de anti-sépticos da CHX (alcoólica, degermante e aquosa) foram distribuídas num volume de 150 mL. Os frascos foram tampados e armazenados em temperatura ambiente por 7 dias com agitação diária. A agitação das almotolias foi realizada três vezes ao dia: às 8:00h, às 14:00 e às 20:00h (APÊNDICE A), para que a solução anti-séptica entrasse em contato com superfícies acima do nível dos 150 mL preenchidos.

Durante esses sete dias, alíquotas de 1 mL de cada uma das 90 soluções de CHX em teste foram diariamente pipetadas e transferidas para os tubos contendo os meios de cultura com neutralizante Tween 80 0,5%, a fim de verificar crescimento da *S. marcescens*. Desta forma, ao final dos sete dias, foram cultivados 630 meios TSB (90 por dia), inoculados com a amostra de anti-séptico contaminado com o microrganismo-teste. Os tubos inoculados foram incubados em temperatura ambiente durante 21 dias, com

leitura diária na primeira semana e nos 7º, 14º e 21º dias. Ressalte-se que a temperatura ótima de crescimento da *S. marcescens* é em torno de 22°C.

Após um mês, o estudo prosseguiu com o grupo II, seguindo-se o mesmo método de trabalho, em que foram testadas 90 soluções de PVP-I também nas três diferentes formulações (alcoólico, degermante e aquoso).

As figuras 5 e 6 demonstram a coleta dos anti-sépticos e transferência para os meios de cultura nos grupos I e II.

Figura 5 -Transferência dos anti-sépticos para os meios de cultura - Grupo I

Figura 6- Transferência dos anti-sépticos para os meios de cultura – Grupo II

O período de acompanhamento da contaminação dos anti-sépticos por sete dias reproduziu o tempo máximo que o anti-séptico permanece armazenado na mesma almotolia na prática assistencial. As almotolias foram movimentadas diariamente (3 vezes/dia) para que a solução anti-séptica entrasse em contato com superfícies acima do nível da solução.

O planejamento da coleta dos dados está apresentado na figura 7.

Figura 7 - Fluxograma dos experimentos com as soluções de CHX e PVP-I

Controle positivo: foi avaliado o crescimento do microrganismo-teste em sete mL do meio TSB, para controle de qualidade da viabilidade da cepa e adequação da mesma ao meio de cultura preparado (dois tubos).

Controle negativo: meios TSB límpido (dois tubos) incubados a 22°C por 72 horas, indicando ausência de microrganismos.

4. RESULTADOS

Primeiramente foram testadas as soluções de clorexidina (grupo I). As soluções de PVP-I (grupo II) foram testadas após um mês.

Nos experimentos do grupo I, alíquotas de 1 mL de cada uma das 90 amostras da solução de CHX foram cultivadas nos 630 meios TSB durante os sete dias.

Após 21 dias de incubação (decorridos após o sétimo dia de cultura), 100% dos meios de cultura permaneceram límpidos, acusando crescimento negativo de microrganismos. A figura 8 ilustra esta situação.

Figura 8 - Meios límpidos após 21 dias de incubação

Os dois tubos do controle positivo do Grupo I turvaram em 24 horas, sendo que em 48 horas foi visualizada a coloração avermelhada, característica da presença da *S. marcescens* no meio. Estes foram ainda semeados em placa, onde se verificaram incontáveis unidades formadoras de colônias de *S. marcescens*.

Os meios de cultura representantes do controle negativo permaneceram límpidos durante os 21 dias de leitura.

As figuras 9 e 10 mostram as características do crescimento da *S. marcescens* no experimento.

Figura 9 - Controle positivo com turvação e coloração após 24 e 48 horas de incubação, respectivamente

Figura 10 - Placa do controle positivo mostrando incontáveis unidades formadoras de colônias de *S. marcescens*

Para certificação da técnica de neutralização, ou seja, comprovação de que não haveria resíduos de anti-séptico no meio, acusando resultado falso-negativo, seis meios inoculados com o anti-séptico após os 21 dias de incubação foram selecionados aleatoriamente e submetidos à contaminação adicional do microrganismo testado, sendo que todos apresentaram característica de crescimento da *Serratia marcescens* em 48 horas.

Os procedimentos experimentais foram os mesmos no grupo II (PVP-I), onde os meios foram preparados acrescidos de sulfito de sódio 0,1%. Neste grupo, todos os meios inoculados também permaneceram límpidos após 21 dias de incubação. Os controles positivos turvaram em 24

horas e apresentaram a coloração avermelhada em um tempo superior ao do grupo I, em 72 horas.

Os dados de crescimento do microrganismo no Grupo I e II estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos resultados das culturas microbiológicas dos anti-sépticos testados no Grupo I e Grupo II, após 21 dias de incubação. São Paulo, 2007.

<i>Resultados</i>	<i>Grupo I – CHX</i>	<i>Grupo II – PVP-I</i>	<i>Controle Positivo</i>	<i>Controle Negativo</i>
Crescimento Positivo	0/630	0/630	2/2	0/2
Crescimento Negativo	630/630	630/630	0/2	2/2

A diferença de tempo na coloração dos controles positivos do grupo I e II, está ilustrada no quadro 5.

Quadro 5 - Recuperação da *Serratia marcescens* nos controles positivos do Grupo I e Grupo II.

	Leitura 24 horas	Leitura 48 horas	Leitura 72 horas	Leitura 7º dia	Leitura 14º dia	Leitura 21º dia
Controle positivo Grupo I - CHX	T**	CA***	CA	CA	CA	CA
Controle positivo Grupo II - PVP-I	T**	T	CA***	CA	CA	CA

* L: Límpido

** T: Turvo

***CA: coloração avermelhada

Como todos os resultados acusaram crescimento negativo, o estudo não prosseguiu para a fase 2, conforme o fluxograma apresentado na figura 7.

5. DISCUSSÃO

A forma de processamento de almotolias de múltiplo uso é uma prática que não está esclarecida na literatura, e é amplamente discutida nos serviços de saúde sem respaldo científico.

Os objetivos deste estudo constituíram-se em avaliar a sobrevivência dos microrganismos nas diferentes formulações dos anti-sépticos – CHX e PVPI-I – após contaminação intencional das almotolias com *Serratia marcescens* e extrapolar os resultados laboratoriais para o cuidado mínimo a ser dispensado às almotolias de múltiplo uso para o envase dos anti-sépticos testados.

O caminho metodológico traçado para responder ao questionamento sobre a forma segura do reprocessamento de almotolias foi verificar a capacidade dos anti-sépticos de inativar os microrganismos intencionalmente inoculados nas almotolias por meio de uma contaminação desafio na ordem de 1×10^5 UFC/mL. Este inóculo foi considerado expressivo frente à possível contaminação a que os anti-sépticos seriam expostos quando envasados em almotolias apenas limpas com água potável e detergente, entre um envase e outro.

O resultado esperado inicialmente era a recuperação dos microrganismos testes inoculados com posterior progressão do estudo para a Fase 2 (APÊNDICE B), uma vez que há muitos estudos confirmando a contaminação dessas soluções, inclusive como fonte comprovada de surtos hospitalares (Marrie, Costerton, 1981; Berckelman et al., 1981; Goetz, 1989; Anderson et al., 1990; Archibald, 1997; Vigeant, Loo, Bertrand, 1998; Bouallegue, Mzoughi, Weill, 2004). O estudo não avançou para a Fase 2, pois os resultados dos trabalhos laboratoriais da Fase 1 demonstraram que os anti-sépticos estudados foram capazes de inibir o crescimento de uma quantidade considerável de *S. marcescens*, na ordem de 1×10^5 UFC/mL. Ressalte-se a surpreendente capacidade de inativação da clorexidina aquosa 0,2%, formulação testada que apresentava a menor concentração.

O delineamento do estudo para a Fase 2, em caso de crescimento em qualquer das formulações testadas na Fase 1, seria de contaminar as

almotolias e submetê-las à limpeza antes do abastecimento com 150 mL das três diferentes formulações anti-sépticas do PVP-I e da CHX. Essas novas soluções seriam submetidas à cultura, sendo que, em caso de crescimento positivo, os recipientes passariam por diferentes métodos de desinfecção e esterilização antes de serem envasadas com as novas soluções. Pelo raciocínio dedutivo, a demonstração de segurança após a limpeza certificaria o mesmo para a desinfecção ou esterilização.

Ao extrapolar os resultados dos experimentos da presente investigação, constata-se que a limpeza é o procedimento mínimo para reutilização segura das almotolias, porque a carga de microrganismos presentes no recipiente apenas limpo seria certamente menor do que o inóculo desafio de 1×10^5 UFC/mL. Sendo assim, um novo desafio surge no processamento desses recipientes: o da contaminação heterogênea da água para o enxágüe. Pesquisadores têm demonstrado a baixa carga microbiana em materiais cirúrgicos após realização da limpeza, em média, 10^2 UFC/material (Chan-Myers, Mcalister, Antonoplos, 1997; Rutala et al., 1998; Chu et al., 1999).

Como referencial legal dos parâmetros de potabilidade da água, a portaria nº 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde, “estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências”. Nela encontramos o padrão microbiológico esperado (ANEXO A), com uma tolerância de contaminação muito inferior ao inóculo testado na presente investigação: ausência de *E. coli* ou coliformes termotolerantes em 100 mL de água. Adicionalmente, a Sabesp - Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - realiza o processo de tratamento da água, cuja finalidade é reduzir as impurezas até os níveis em que ela pode ser considerada potável (ANEXOS B e C).

Esta investigação é um estudo inédito *in vitro*, visto que todas as publicações que apresentaram contaminação de anti-séptico são resultados de situações de surtos na prática assistencial.

Dentre os estudos que reportaram contaminação do anti-séptico, Archibald (1997) identificou a fonte de um surto por *S. marcescens* em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal por meio de um estudo retrospectivo de caso-controle com microbiologia do ambiente. Os resultados de identificação da cepa demonstraram que a *Serratia* isolada nos casos apresentava padrão DNA idêntico ao microrganismo isolado no anti-séptico. Após nove meses desta publicação, Spainhour (1998) publicou uma carta ao editor com referências ao estudo de Archibald (1997). Nessa carta, o autor sustenta que, em casos reportados de contaminação de anti-sépticos, a conclusão freqüentemente apresentada é que o princípio ativo do produto não é efetivo, pois é um meio viável para a sobrevivência de microrganismos. Entretanto, a contaminação das soluções anti-sépticas envolve principalmente cuidados inadequados que levam a falhas na estabilidade da formulação do produto e sua preservação. A observação do Spainhour (1998) é bastante pertinente frente aos resultados encontrados na presente investigação.

Situação semelhante foi relatada por Goetz (1989), seguida de uma publicação em editorial de Anderson (1989). Aquele autor associou significativamente as infecções em pacientes dialíticos ambulatoriais com a contaminação do PVP-I por *P. aeruginosa*, por meio de um estudo epidemiológico dos casos. Não houve a realização de estudos de tipagem para confirmação de similaridade entre a linhagem clínica e a da contaminação do PVP-I. Anderson (1989) relata posteriormente, a falta de boas práticas de fabricação na preparação do anti-séptico, inclusive com contaminação da água utilizada. A associação epidemiológica da contaminação do PVP-I, nos casos de bacteremia neonatal relatados por Bouallegue, Mzoughi, Weill (2004) também não pôde ser comprovada como fonte do surto, uma vez que não houve investigação ambiental da fonte.

Berkelman et al.(1981) investigaram os casos de pseudobacteremia atribuídos à contaminação do PVP-I com *Pseudomonas*, em que encontraram, após filtração da solução, pequena quantidade de debris orgânicos, que podem ter conferido proteção mecânica ao contaminante.

A capacidade de sobrevivência prolongada de *Pseudomonas cepacia* em soluções iodóforas reportada por Anderson et al.(1990) foi atribuída a formação de glicocálice extracelular depositado na superfície do recipiente – biofilme, evidenciada por meio de microscopia eletrônica.

Marrie e Costerton (1981) descreveram a sobrevivência prolongada de *S. marcescens* em clorexidina a 2%, que ocasionou um surto por este microrganismo em um hospital do Canadá. Estudos por meio de microscopia eletrônica revelaram que o microrganismo estava aderido em uma matriz na parede do recipiente de distribuição da solução, sustentando sua sobrevivência no anti-séptico.

A formação do biofilme é um processo pelo qual os microrganismos aderem irreversivelmente à superfície e aí crescem, produzindo polímeros extracelulares que facilitam a adesão e a formação da matriz. No entanto, os métodos físicos, tais como a limpeza mecânica ou a fricção e ainda o ultrassom, são efetivos e garantem sua remoção, se realizados de forma adequada (Donlan, 2001).

A investigação de um surto por *Serratia marcescens* descrita por Vigeant, Loo, Bertrand (1998) levou a clorexidina como fonte, principalmente porque a solução a 4% foi diluída a 2% com água não estéril antes de ser distribuída para as áreas assistenciais do hospital, o que caracterizou uma má prática de manipulação. Adicionalmente, 80% dos casos de infecção isolaram a mesma linhagem da *Serratia* contida nos recipientes.

Finalmente, os autores que descreveram um surto de bacteremia por *Burkholderia cepacia* em uma unidade de hemodiálise associaram a contaminação da clorexidina utilizada na anti-sepsia do local da inserção do cateter à ocorrência dos casos. A solução a 5% era diluída para 2,5% com água deionizada, cuja amostra estocada comprovou contaminação por *B. cepacia* (Gómez et al., 2008).

Os principais referenciais consultados sobre contaminação de anti-sépticos apontam questões de manuseio, armazenamento e cuidado inadequados das soluções, variáveis que foram controladas nesta investigação laboratorial. Fatores como contaminação decorrente de armazenamento precário do anti-séptico, recipientes sem vedação e outras

fontes de contaminação podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela contaminação encontrada na prática. Há também descrição de fatores físicos, como alterações de temperatura e pH, que propiciam o crescimento de microrganismos, além de cuidados inadequados que levam a problemas na estabilidade do produto (Jones, 1999; Russel, 2003).

Como mencionado anteriormente, as concentrações atualmente utilizadas na prática dos serviços de assistência à saúde são substancialmente maiores que a CIM (Concentração Inibitória Mínima) destas bactérias (Mcdonnell, Russel; 1999; Penna, Mazzola, Martins, 2001; Russel, 2004; Rutala, 2006). Sendo assim, a contaminação de soluções anti-sépticas não está necessariamente associada à redução de susceptibilidade dos microrganismos.

Esta investigação utilizou-se do raciocínio dedutivo para considerar a limpeza como procedimento mínimo no processamento das almotolias em que os anti-sépticos são envasados. Esta consideração está fortemente pautada nos trabalhos de Chan-Myers; Mcalister; Antonoplos (1997), Rutala et al. (1998) e Chu et al. (1999), em que o número de microrganismos recuperados de materiais apenas limpos foi na ordem de 10^2 UFC, bem como nos parâmetros legais de potabilidade da água.

Considerando esse raciocínio dedutivo, os cuidados adequados com a limpeza, o enxágüe e a secagem das almotolias tornam-se importantes para o controle da segurança. Resíduos de detergentes eventualmente poderão desestabilizar as formulações químicas, assim como resíduos da água do enxágüe, diluir a concentração dos anti-sépticos.

Estudos complementares poderão confirmar esse raciocínio dedutivo, analisando os microrganismos residuais (quantitativa e qualitativamente) de almotolias apenas limpas em diferentes instituições hospitalares.

Por fim, os resultados deste estudo trazem respostas para a prática de processamento das almotolias, que até o momento não estava respaldada na ciência. A utilização repetida destes recipientes após o processo de limpeza fica certificada por se tratar de uma prática segura, agregando facilidades e economia para as centrais de esterilização de

materiais nas instituições de saúde. Podemos inclusive mencionar a questão ecológica envolvida, com redução da geração de resíduos de serviços de saúde provenientes de artigos descartáveis.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

- Os anti-sépticos testados (clorexidina e o PVP-I nos veículos aquoso, degermante e alcoólico) inativaram os microrganismos intencionalmente inoculados nas almotolias, em uma concentração de 1×10^5 UFC/mL.
- Considerando que as almotolias apenas limpas carregam microrganismos vegetativos da água do enxágüe, na ordem de 10^2 UFC, por dedução, pode-se afirmar que a limpeza é considerada segura como procedimento mínimo para utilização repetida destes recipientes na distribuição dos anti-sépticos testados – Clorexidina e PVP-I nas formulações detergente, aquosa e alcoólica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderson RL. Iodophor antiseptics: Intrinsic microbial contamination with resistant bacteria [editorial]. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989; 10(10): 443-46.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Higienização das mãos em serviços de saúde. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/hotsite/higienizacao_maos/index.htm.

Anderson RL, Vess RW, Panlilio AL, Faver MS. Prolonged survival of *Pseudomonas cepacia* in commercially manufactured povidone-iodine. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 3598-600.

Archibald LK, Corl A, Shah B, Schlte M, Arduino MJ, Aguero S, et al. *Serratia marcescens* outbreak associated with extrinsic contamination of 1% chloroxylonol soap. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997; 18(10): 704-9.

Bouallegue O, Mzoughi R, Weill F. Outbreak of *Pseudomonas putida* bacteraemia in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2004; 57: 88-91.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1998. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998. Dá as diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

Berkelman RL, Lewin S, Allen JR, Anderson RL, Budnick LD, Shapiro S et al. Pseudobacteremia attributed to contamination of povidone-iodine with *Pseudomonas cepacia*. *An Inter Med* 1981; 95: 32-6.

Bruch MK. Methods of testing antiseptics: antimicrobial used topically in humans. In: Block, S.S. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1991. p.946-63.

Crabtree TD, Pelletier SJ, Pruett TL. Surgical antisepsis. In: Block SS. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Williams & Wilins, 2001. p. 919-34.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Guideline for hand hygiene in health-care settings. MMWR 2002; 51 (RR-16): 1-45.

Center for Disease Control and Prevention. Guideline for prevention of surgical site infection. Infect Control Hosp Epidemiol, 1999; 20(4): p 247-78.

Cerqueira MCM. Princípios gerais e anti-sépticos. In: Rodrigues EAC. Infecções hospitalares: Prevenção e controle. São Paulo (SP): Savier, 1997. p. 426-34.

Chan-Myers H, McAlister D, Antonoplos P. Natural bioburden levels detected on rigid lumened medical devices before and after cleaning. Am J Infect Control 1997; 25(6): 471-6.

Chu NS, Chan-Myers H, Ghazanfari N, Antonoplos P. Levels of naturally occurring microorganisms on surgical instruments after clinical use and after washing. Am J Infect Control 1999; 27: 315-9.

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (Sabesp) [homepage na Internet]. São Paulo. Disponível em <http://www.sabesp.com.br>.

Denton GW. Chlorhexidine. In: Seymour S. Block. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Williams & Wilins, 2001. p. 321-36.

Donlan RM. Biofilm and device-associated infection. Emerging Infect Dis 2001; 7(2): 277-81.

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin Microbiol Infect 2000; 6(9): 503-8.

Gottardi W. Iodine and Iodine Compounds. In: Block SS. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001. p. 159-83.

Graziano KU, Silva A, Bianchi ERF. Limpeza, desinfecção, esterilização de artigos e anti-sepsia. In Fernandes, A.T. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu, 2000: 226-305.

Goetz A, Muder RR. *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with use of povidone – iodine in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. Infect Control Hosp Epidemiol 1989; 10(10): 447-9.

Gómez R et al. Outbreak of *Burkholderia cepacia* caused by contaminated chlorhexidine in a hemodialysis unit. Infect Control Hosp Epidemiol 2008; 29(4): 377-8.

Jones RD. Bacterial resistance and topical antimicrobial wash products. *Am J Infect Control* 1990; 27:351-63.

Koljalg S, Naaber P, Mikelsaar M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *J Hosp Infect* 2002; 51:106-113.

Langgartner J, Linde HJ, Lenh N, Reng M, Scholmerich J, Gluck T. Combined skin disinfection with chlorhexidine/propanol and aqueous povidone-iodine reduces bacterial colonisation of central venous catheters. *Intensive Care Med* 2004; 30: 1081-8.

Larson E. Skin Cleansing. In: Wenzel, R.P. Prevention and control of nosocomial infections. 2^o ed. Philadelphia: Williams and Wilkins 1993: 450-57.

Larson E, Duarte CG, Lee LV, Della-Lata P, Kain, DJ, Keswick BH. Microbial flora of hands of homemakers. *Am J Infect Control* 2003; 31:72-9.

Larson E, Aiello, AE. Antibacterial cleaning and hygiene products as an emerging risk factor for antibiotic resistance in the community. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 501-6.

Marrie TJ, Costerton W. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol* 1981; 42(6): 1093-102.

McDonnell G, Russel AD. Antiseptics, and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(1):147-79.

Miyagi F. Contaminação bacteriana em desinfetantes. *Rev Saúde Pública* 2000; 34(5):444-8.

Mody L, Bradley SF, Strausbaugh LJ, Muder RR. *In vitro* activity of a nonmedicated handwash product, chlorhexidine, and an alcohol-based hand disinfectant against multiply persistent gram-positive microorganisms. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22(4):194-6.

Molina E. Anti-sepsia. In: Limpeza, desinfecção de artigos e áreas hospitalares e anti-sepsia. São Paulo (SP): APECIH, 2004. p. 34-55.

Penna TCV, Mazzola PG, Martins MAS. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infect Dis* 2001. URL Disponível em <http://www.biomedcentral.com/147-2334/1/16>.

Russel AD. Factors influencing the efficacy of germicides. In: Rutala W.A. Disinfection, sterilization and antisepsis: Principles, practices, challenges, and new research, 2003; p.162-70.

Russel, AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is a not a new phenomenon. J Hosp Infect 2004; 57:97-104.

Rutala WA. APIC Guideline for selection and use of disinfectants. Am J Infect Control 1996; 24(4): 313-35.

Rutala WA, Gergen MF, Jones JF, Weber DJ. Levels of microbial contamination on surgical instruments. Am J Infect Control 1998;26:143-5.

Rutala WA. Disinfection, sterilization and antisepsis: principles, practices, challenges, and new research. Florida: APIC, 2006: p.49-58.

Spainhour S. Letters to the Editor. *Serratia marcescens* outbreak associated with extrinsic contamination of 1% chloroxylonol soap [editorial]. Infect Control Hosp Epidemiol 1998; 18: 476.

Soares VS, Hernandez SED, Ogassawara RLN, Kwabara HN, Garcia LB, Cardoso CL. Remoção de *Serratia marcescens* (Enterobacteriaceae) das mãos pelo uso de diferentes agentes degermante. Acta Scient 2002; 24(3): 719-25.

Sheikh W. Development and validation of a neutralizer system for *in vitro* evaluation of some antiseptics. Antim Agents Chemotherapy 1981;19(3): 429-34.

Spaulding EH. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Laurence CA, Block SS. Disinfection, sterilization, and preservation. 1st ed. Lea & Febiger, 1968; 517-31.

Thomas JL, Maillard Y, Lambert RJW, Russel AD. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a “residual” concentration. J Hosp Infect 2000;46: 297-303.

United States Pharmacopeia. 25th ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention 2007. USP 30 – NF 25.

USA Food and Drug Administration. Department of health and human services. Monograph for health-care antiseptic drug products; Part III. Proposed Rule, 59 Federal Register, 1994.

USA Food and Drug Administration. Department of health and human services. Topical antiseptic review. Memorandum, september 22, 2005.

Vigeant P, Loo VG, Bertrand C. An outbreak of *Serratia Marcescens* infections related to contaminated chlorhexidine. Infect Control Hosp Epidemiol 1998; 19:791-94.

Weber DJ, Rutala WA. Use of germicides in the home and the healthcare setting: is there a relationship between germicide use and antibiotic resistance? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:1107-19.

Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett E.E. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. In: Rutala WA. *Disinfection, sterilization, and antisepsis: principles, practices, current issues, and new research*, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Controle de Agitação das Almotolias

Dia da cultura	Horário	Assinatura / Visto
D 1	8:00 h	
	14:00h	
	20:00h	
D 2	8:00 h	
	14:00h	
	20:00h	
D 3	8:00 h	
	14:00h	
	20:00h	
D 4	8:00 h	
	14:00h	
	20:00h	
D 5	8:00 h	
	14:00h	
	20:00h	
D 6	8:00 h	
	14:00h	
	20:00h	
D 7	8:00 h	
	14:00h	
	20:00h	

APÊNDICE B - Fluxograma dos experimentos programados para a Fase 2

APÊNDICE C – Metodologia de trabalho

O que	Como
1- Preparo do meio de cultura	<ul style="list-style-type: none"> - Diluir 30g de TSB em 1 L de água destilada. Dissolver em banho-maria. - Acrescentar o neutralizante específico (Tween 80 ou Sulfito de sódio). - Colocar 7 ml do meio em cada tubo com uma seringa de 10 mL. - Esterilizar os meios em autoclave gravitacional em 121° C por 15 min. - Observar turvação do meio durante 72h. - Armazenar o meio em geladeira.
2- Esterilização do meio	Para a autoclave: 1- Fechar o ducto de drenagem, 2- Preencher a autoclave com água corrente até o nível da resistência, 3- Colocar o conteúdo a ser esterilizado, 4- Fechar a autoclave alternando as borboletas, 5- Ligar a autoclave no máximo, 6- Retirar conteúdo de ar da autoclave 3x, 7- Quando atingir a temperatura, passar para o nível mínimo.
3-Preparo da suspensão de <i>Serratia marcescens</i> 10 ⁵ UFC/mL	<p>Deixar material preparado: cepa original, solução salina estéril, escala de Mc Farland (3 x 10⁸ UFC/mL), pipetas esterilizadas, balão esterilizado.</p> <p>Turvar a solução salina na escala de Mc Farland.</p> <p>Diluir 1000x esta turvação na solução salina. ou seja, pipetar 0,1 mL da turvação em 100 mL da solução salina.</p>
4- Contaminação das Almotolias	<p>Abrir as almotolias esterilizadas sob a bancada.</p> <p>Pipetar 1 mL da suspensão e transferir para cada almotolia.</p> <p>Contaminar toda a parede da almotolia com movimentos circulares.</p> <p>Preencher as almotolias com 150 mL do anti-séptico.</p> <p>Movimentar as almotolias 3x ao dia.</p>
5- Cultura dos anti-sépticos	<p>Realizar a desinfecção da capela de fluxo laminar com álcool 70%.</p> <p>Colocar todo o material na capela: 30 meios de cultura devidamente identificados, almotolias (ordem: 30 aquosas, 30 degermantes, 30 alcoólicas) pipeta automática, ponteiras para pipetas, estante vazia, coletor de ponteiras, luva de procedimento.</p> <p>Proceder a paramentação com máscara cirúrgica, touca e luva de procedimento.</p> <p>Seqüência para semear: abrir a almotolia, pegar ponteira com a micropipeta, abrir o tubo com meio de cultura com a mesma mão, pipetar 0,1 mL do anti-séptico na almotolia, tampar o tubo com meio de cultura e colocá-lo na estante vazia, desprezar a ponteira utilizada, colocar a micropipeta sobre a estante, fechar a almotolia e separá-la das outras.</p>

ANEXOS

ANEXO A - Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano segundo a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 - MS.

Parâmetro	VPM ⁽¹⁾
Água para consumo humano ⁽²⁾	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100 mL
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100 mL
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
<i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100 mL
Coliformes Totais	<p>Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês. <p>Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100 mL.

NOTAS: (1) Valor Máximo Permitido

(2) Água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.

(3) A detecção de *E. coli* deve ser preferencialmente adotada.

ANEXO B – Tratamento de água realizado pela Sabesp

🏠 página principal	
📄 O que fazemos	Tratamento de Água Página principal
<p>Processo convencional envolve etapas para reduzir impurezas e tornar a água potável</p>	<p>Toda água fornecida à população é tratada. A finalidade é reduzir as impurezas até os níveis em que ela pode ser considerada potável.</p> <p>Após a captação, a água é bombeada para as estações de tratamento, também conhecidas como ETAS.</p> <p>O processo realizado pela Sabesp é o convencional e consiste nas seguintes etapas:</p> <p>Pré cloração: Adição de cloro assim que a água chega à estação para facilitar a retirada de matéria orgânica e metais;</p> <p>Pré-alkalinização: Adição de cal ou soda à água para ajustar o pH aos valores exigidos para as fases seguintes do tratamento.</p> <p>Coagulação: Adição de sulfato de alumínio, cloreto férrico ou outro coagulante, seguido de uma agitação violenta da água para provocar a desestabilização elétrica das partículas de sujeira, facilitando sua agregação.</p> <p>Floculação: Mistura lenta da água para provocar a formação de flocos com as partículas</p> <p>Decantação: Passagem da água por grandes tanques para decantar os flocos de sujeira formados na floculação</p> <p>Filtração: Passagem da água por tanques que contêm leito de pedras, areia e carvão antracito para reter a sujeira que restou da fase de decantação.</p> <p>Pós-alkalinização: Correção final do pH da água para evitar problemas de corrosão ou incrustação das tubulações</p> <p>Desinfecção: Adição de cloro à água antes de sua saída da Estação de Tratamento para manter um teor residual, até a chegada na casa do consumidor, e garantir que a água fornecida fique isenta de bactérias e vírus.</p> <p>Fluoretação: Adição de flúor à água para a prevenção de cáries</p>

ANEXO C – Distribuição de água preconizado pela Sabesp

[página principal](#)

[O que fazemos\ Distribuição de Água](#)

Clientes devem cuidar das instalações internas e da limpeza e conservação da caixa d' água

Após o tratamento, a água tratada é armazenada inicialmente em reservatórios de distribuição e depois em reservatórios de bairros, espalhados em regiões estratégicas das cidades. Desses locais a água vai para as tubulações maiores (denominadas adutoras) e depois para as redes de distribuição até chegar aos domicílios.

Geralmente o armazenamento é feito em caixas d'água. A responsabilidade da Sabesp é entregar água até a entrada da residência onde estão o cavalete e o hidrômetro (o relógio que registra o consumo de água).

A partir daí, o cliente deve cuidar das instalações internas e da limpeza e conservação do reservatório.

Para conservar o processo de tratamento realizado anteriormente, a Sabesp recomenda que a caixa d'água seja limpa a cada 6 meses e sempre esteja devidamente tapada para evitar sujeira e contaminação por insetos ou animais.