UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Áreas Limpas: Estudo de Correlação entre Partículas
Viáveis e Não Viáveis**

Catherine Simões de Abreu

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora :
Profa. Dra. Terezinha J. Andreolli Pinto

São Paulo

1999

Catherine Simões de Abreu

Áreas Limpas: Estudo de correlação entre partículas viáveis
e não viáveis

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Profa. Dra. Terezinha J. Andreolli Pinto
Presidente e Orientador

Profa. Maria José Vieira Fonseca
Primeiro Examinador

Prof. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo
Segundo Examinador

São Paulo, 08 de novembro de 1999.

Agradecimentos

À minha orientadora Profa. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, pela oportunidade, apoio, incentivo e principalmente exemplo de vida a ser seguido.

À minha família, pelo apoio na vida pessoal e incentivo na vida profissional.

Aos meus amigos Eduardo, Débora, Vinícius, Lilian, Ivone, Márcia, Kazumi, Mike e Fernando pela paciência e ajuda nos momentos necessários.

À Monica e Carlos Domenech pela análise estatística dos resultados.

Às Profas. Mitsuko T. Ohara, Erika Rosa Kedor e Maria Aparecida Nicoletti pela correção e avaliação do trabalho na fase de qualificação.

Às secretárias da Pós Graduação e a bibliotecária Adriana da Biblioteca do Conjunto das Químicas pela orientação.

E por fim, à todo pessoal da Eli Lilly, em especial o grupo de Controle de Qualidade e o gerente Cláudio Sombini, que colaboraram para a concretização do trabalho.

INDICE

1. Introdução	pag. 01
2. Objetivo	pag. 03
3. Revisão Bibliográfica	pag. 03
3.1.1. Classificação	pag. 05
3.1.2. Critérios de Obtenção	pag. 09
3.2. Pessoal em Sala Limpa	pag. 14
3.2.1. Treinamento	pag. 15
3.3. Certificação de Salas Limpas	pag. 17
3.3.1. Teste Primários	pag. 18
3.3.2. Testes Secundários	pag. 19
3.4. Caracterização da Sala Biolimpa	pag. 23
3.4.1. Caracterização do “Bioburden” Ambiental e Humano	pag. 25
3.4.2. Identificação dos Contaminantes Microbianos	pag. 28
4. Material e Método.....	pag. 29
4.1. Material	pag. 29
4.2. Método	pag. 32
4.2.1. Amostragem e Qualificação de Partículas	pag. 32
4.2.2. Identificação dos Microorganismos Contaminantes	pag. 39
5. Resultados e Discussão	pag. 50
5.1. Análise Estatística de “Rotina 1”	pag. 53
5.2. Análise Estatística da “Qualificação 2”	pag. 58
5.3. Análise Estatística dos Dados da “Rotina 2”	pag. 63
5.4. Estudo dos Microrganismos Presentes por Classe de Sala Limpa.	pag. 67
6. Conclusão	pag. 72
7. Referência Bibliográfica	pag. 74
8. Sumário	pag. 82
9. Sumary	pag. 83

1 - INTRODUÇÃO

A produção de medicamentos em geral tem sido aperfeiçoada com o passar dos anos, nos diferentes aspectos. Exigências mais restritivas quanto a especificações das matérias-primas, assim como ao seu processo de obtenção levam aos requisitos de qualificação do seu produtor. Aspectos do local onde se instala a indústria farmacêutica, o impacto sobre ela das atividades desenvolvidas em sua proximidade, assim como da mesma sobre as condições ecológicas da região, além de exigências para os itens da edificação são hoje delineados nos tratados técnicos, e na regulamentação da área de saúde.

Itens inerentes a aprovação dos procedimentos abrangem a certificação de ambientes, validação de processos, objetivando sempre a obtenção de produtos que atendam a especificação, e nos quais estejam implícitos todos os itens de qualidade, inclusive os testes que são empregados métodos não objetivos. Em se tratando de produtos farmacêuticos, a utilização segura e eficaz são quesitos indispensáveis. Sabe-se que os cuidados exigidos não se restringem à atividade interna à instalação industrial, pois o produto deve estar disponível ao paciente mantendo as características de qualidade. É portanto fundamental que o sistema inclua armazenamento e distribuição adequados, com rastreabilidade em todas as instâncias.

Na idealização de todo o sistema está o ser humano, ao qual se atribui a responsabilidade e mérito pelo desenvolvimento do produto, pela sua qualidade, pela efetiva obtenção e dispensação do produto farmacêutico, assim como por uma prescrição e assistência farmacêutica adequadas.

Exercendo ações administrativas ou operacionais, hoje se reconhece a importância da qualificação, treinamento e motivação do ser humano. Enquanto vinculado aos aspectos da atividade produtiva, sabe-se também ser o elemento humano o fator dos mais representativos como fonte de contaminação, em especial a microbiana.

Existe hoje tecnologia altamente desenvolvida no sentido de se trabalhar as condições de barreira, restringindo o mais possível a exposição da superfície corpórea, empregando máscaras faciais, de forma que a distribuição de partículas a partir do ser humano seja minimizada. Na medida que, adicionalmente a barreiras físicas, este elemento estiver também imbuído da conscientização de que seus movimentos devem ser lentos, uniformes, e que a expressão verbal deve ser minimizada, estará sob controle a emissão de partículas por ele promovida.

Estando o elemento humano em um espaço controlado, de superfícies lisas que não liberem partículas, sem cantos ou saliências que permitam a sua deposição, e que seja alimentado por um ar de elevada qualidade quanto a isenção de partículas, chega-se próximo à condição ideal para a produção farmacêutica, particularmente daqueles produtos estéreis, destinados a administração parenteral, e uso oftálmico.⁵⁹

Retornando à visualização do ser humano recomenda-se que utilize vestimenta de natureza sintética, para que não libere partículas, portanto a condição de conforto exige que a área seja provida de ar condicionado, de forma que a temperatura e umidade relativa proporcionem o conforto necessário, ainda compatibilizando com as exigências do produto. A iluminação deve ser adequada, respeitando características aerodinâmicas necessárias. O ar insuflado no ambiente que se descreve, em fluxo laminar a partir do teto e lateralmente captado antes do contato com o piso, é tratado em sistema central e passa por filtros de alta eficácia de retenção de partículas (HEPA). A este ambiente, no qual se insere o ser humano devidamente protegido, denomina-se sala biolimpa ou limpa. Sofreu grande evolução quando dos desenvolvimentos espaciais da National Aeronautics & Space Administration (NASA), em que se buscava simultaneamente a ausência de partículas viáveis, representadas pelos microrganismos, assim como ausência de partículas de qualquer natureza, orgânica ou inorgânica, não viável e que tanto é relevante por se constituir em contaminante indesejável, como por ser um suporte para a

veiculação da partícula viável. Também a indústria eletro-eletrônica aproveitou esta tecnologia, adequando-a às suas condições e peculiaridades, em que a existência de forma viável não compromete o produto. A distinção que essencialmente se faz entre estas áreas e aquelas destinadas à produção farmacêutica é quanto a importância em se avaliar a presença, quantificar e identificar as partículas viáveis.

2 - OBJETIVO

O objetivo deste trabalho consistiu em comparar o número de partículas não viáveis e partículas viáveis (contaminação microbiana) em salas-limpas, a fim de verificar se há correlação entre as mesmas. O trabalho avaliou ainda o efeito da sanitização e do movimento (dinâmico ou repouso) sobre o número de partículas não viáveis e viáveis por classe de sala limpa. Procedeu-se também à identificação das cepas encontradas seguida de um estudo de frequências.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção asséptica de medicamentos estéreis exige aderência a orientações abrangentes e rígidas que permitem a obtenção de um produto seguro.³⁴ Entre outros itens, as salas limpas ou biolimpas têm sido um requisito essencial na produção asséptica de medicamentos. Testar a manutenção das condições físicas e microbiológicas do ambiente produtivo tem se tornado um ponto crucial do controle de qualidade do processo.³⁷

Para isso alguns fatores do ambiente de produção devem ser monitorados, tais como: qualidade do ar, água, gases, vestimentas, superfícies, etc. Além disso, deve-se ter em mente que o impacto humano num processo asséptico é crítico, e o grupo deve estar sempre em boas condições de saúde e manter treinamento específico atualizado.⁴

Ao se especificar os fatores do ambiente a serem monitorados, deve-se incluir os testes para determinação de: partículas não viáveis de 0,5µm ou maiores, partículas viáveis, ou seja, contaminação microbiana representada por unidades formadoras de colônias (UFC) provenientes do ambiente e das superfícies.

Em geral, *Guidelines*^{34, 60} são utilizados como referências para se estabelecer procedimento e limites relativos ao monitoramento ambiental dentro de indústrias farmacêutica ou de correlatos. Seu emprego é plenamente justificável quando uma fábrica se encontra em fase inicial com parâmetros a definir. Porém depois de obtidos dados suficientes é necessário a determinação dos próprios limites, evitando-se assim o uso dos *Guidelines*.

A Internacional Pharmaceutical Federation (IPF) apresenta, de forma detalhada, as atividades inerentes à validação e monitoramento de preparações farmacêuticas assepticamente processadas. Apresenta limites sugeridos, técnicas de monitoramento microbiológico para ambientes, superfícies, água, soluções *Bulk*, teste *Media Fill* e pessoal. Aborda também, brevemente, questões de saúde e treinamento dos funcionários.⁶⁶

A Farmacopéia Americana enfatiza que os níveis apresentados não devem ser vistos como absolutos, e os produtores devem definir seus próprios níveis; novamente, sem utilizar referência como os guias.³⁷

Por orientação da cGMP (current Good Manufacturing Practice), as indústrias utilizam dois níveis de limites para cada teste de monitoramento: um nível de alerta e um nível de ação. Os dois níveis são baseados em dados empíricos, com a idéia de que nunca deverão ocorrer problemas trabalhando-se sob as condições especificadas por estes níveis. Os problemas são tipicamente associados à identificação dos microrganismos, e a uma desinfecção extra. A implicação quando limites são excedidos consiste primariamente em sua revisão e possível ampliação, justificável baseando-se no histórico da área, desde que nenhum problema tenha ocorrido com o produto final.

3.1.1. Classificação

As salas limpas podem ser classificadas de acordo com o nível de limpeza e também material particulado suspenso no ar. Geralmente o termo sala-limpa se refere a uma sala na qual a quantidade de partículas de determinados tamanhos é controlada⁸.

Diversas normas internacionais regem a classificação das salas, entre elas o "Federal Standard 209 ", cuja versão atual é indicada pela letra E, no qual se passou a incluir o sistema métrico, e ampliou-se a abrangência dimensional das partículas ²⁸.

Em alinhamento com o Federal Standard 209 E ^{28, 56}, a sala deve ser classificada de acordo com o número de partículas não viáveis encontrado num certo volume de ar. Geralmente as amostragens para medição são de 1m³ de ar ou 1 pé³ de ar. Portanto como exemplo de nomenclatura, temos: classe 100 (a 0,5 µm) que significa ar com não mais de 100 partículas por pé³ de ar de tamanho 0,5 µm ou maior. Assim, classe 100 é 10 vezes mais limpa que classe 1000, que por sua vez é 10 vezes mais limpa que a classe 10.000 e assim por diante. (Figura 1)^{8, 28}.

Figura 1 – Distribuição de tamanho de partículas para distintas classes de acordo com Federal Standard 209 E.²⁸

Adicionalmente à excelência de tecnologia que permite a obtenção das condições ambientais que atendam ao Federal Standard 209 E, exigências crescentes levaram, nos 10 últimos anos, ao desenvolvimento de tecnologia de barreiras e isolamento. Uma das metas a atingir consistia na eliminação de resultados falso positivos nos testes de esterilidade, virtualmente eliminados em certos laboratórios pela adoção de sistemas fechados para execução da metodologia analítica, mas também pelo emprego dos *Isolators*⁴³. Na atividade de produção, também foi extremamente oportuna esta tecnologia, tanto com o intuito de minimizar risco de contaminação em etapas críticas do processo produtivo como na proteção dos operadores, quando por exemplo trabalhando em linhas de enchimento de produtos citostáticos e em certos segmentos de

biotecnologia⁶³. Independente da aplicação pretendida é recomendável o posicionamento do *Isolator* em ambientes classe 10.000.^{21, 42, 48}

O número de amostragens, posições e frequências de monitoramento merecem análise crítica, baseada principalmente nas operações executadas naquele espaço específico² que se tenha em mente. Isto quer dizer que dependendo da tarefa a ser executada, as exigências de qualidade da área quanto ao nível de limpeza podem ser distintas. Desta maneira torna-se obvio o raciocínio de que em áreas em que o produto possa ser exposto este nível deve ser mais rígido do que em áreas em que o produto não é exposto.

Para efeito de classificação de salas limpas, algumas definições estão descritas no *guideline* da Food Drug Administration (FDA) “FDA Guideline on Sterile Products Produced by Aseptic Processing”,³⁴ tais como: superfícies críticas, áreas críticas, áreas controladas, áreas de processo asséptico, áreas de suporte para áreas de processo asséptico, áreas não assépticas controladas, áreas não classificadas⁶.

Segundo AGALLOCO², as salas podem receber classificação de acordo com a contagem de partículas não viáveis, e também com o tipo de tarefa a ser executada, como segue:

- Classe 100 – áreas designadas a manter classe 100 durante operação.

Zona A1 – zona de processo asséptico ou teste de esterilidade, ou seja, exposição de produto ou material teste. A presença de pessoas deve ser minimizada afim de reduzir o risco de contaminação em superfícies. Estas zonas são definidas como “zonas críticas” para o FDA e Classe A para a Europa.

Zona A2 – Capelas de Fluxo Laminar ou cabines de segurança biológica, que podem estar localizadas tanto em áreas classe 10.000 ou 100.000, para preparação de inóculos, exposição de meio de cultura e outras operações. O pessoal envolvido deve ser monitorado quanto a contaminação nas luvas.

- Classe 10.000 – Áreas designadas a manter classe 10.000 durante a operação.

Zona B1 – Área de Processo Asséptico ou teste de Esterilidade onde ocorre o Acesso de pessoas à materiais estéreis.

Zona B2 – Áreas de suporte para a área de Processo Asséptico. Geralmente nas indústrias áreas deste tipo são utilizadas para autoclaves, fornos, etc., onde o nível de partículas e grau de contaminação são controlados antes que o material sofra processo de esterilização.

Zona B3 – Área de produção onde produtos não estéreis são expostos.

Zona B4 – Áreas de suporte para a zona B3, são áreas de preparação de materiais.

- Classe 100.000 – Áreas designadas a manter a classe 100.000 durante a operação.

Zona C1 – Áreas de suporte para ambientes controlados, onde materiais são expostos antes da esterilização.

Zona C2 – Áreas produtivas de produtos orais, que podem receber classificação para minimizar contaminação.

Muitos outros autores ^{37, 50} e normas internacionais ^{38, 55, 62} classificam as áreas com letras e números diferentes, no entanto o parâmetro principal para a classificação é sempre a contagem de partículas não viáveis ⁴⁴, havendo também recomendações para áreas não só destinadas à produção em escala industrial, como aquelas destinadas à preparações de parenterais de grande volume em farmácias hospitalares ^{13, 19, 26, 72}, que infelizmente pecam muitas vezes pela não aderência aos conceitos básicos de controles e condições indispensáveis.

As áreas limpas conforme definidas no Federal Standard 209 E são apenas especificados quanto a limpeza do ar nelas contido, definindo-se também nesta norma como dimensionar as partículas que servem de base para a sua classificação. Não existem orientações quanto a paramentação ou

mobiliário a ser empregado nas classes específicas, informação disponível nas práticas recomendadas pela Divisão de Controle da Contaminação do Institute of Environmental Sciences and Technology³⁹.

As áreas limpas são também identificadas quanto ao estágio em que se encontram, sendo *as built* uma área limpa que se encontra completa e pronta para operação, com todos os serviços conectados e funcionais porém sem equipamento ou pessoal operando; *at rest* uma área limpa que esteja com todos os serviços funcionando e com equipamentos instalados e pronto para operar ou em operação, porém sem o pessoal operacional; *dynamic* uma sala limpa em operação normal, com todos os serviços funcionando e com os equipamentos e pessoal, se aplicável, presente e desempenhando suas funções em trabalho normal⁵¹.

3.1.2. Critérios de Obtenção

Arquitetura

Em primeiro lugar, o local onde será instalada a área limpa será escolhido em função de seu baixo nível de contaminantes ambiente, tais como poluentes atmosféricos, vibrações do solo, inundações, etc. Várias características devem ser consideradas na escolha do material empregado na sua construção e acabamento⁴⁰.

O revestimento das paredes, pisos, forros e outros componentes não pode ser poroso e nem gerador de partículas, deve apresentar superfícies lisas, isentas de saliências e reentrâncias, laváveis e impermeáveis, resistentes à corrosão e aos agentes de limpeza e desinfecção⁴⁹. Normalmente, os materiais utilizados são resinas de epóxi ou poliuretano, aço inoxidável, alumínio anodizado e laminado melamínico⁴⁰.

Todos os itens devem ser concebidos para facilitar a limpeza e evitar depósitos de partículas e contaminantes incluindo arredondamento dos

cantos, portas desmontáveis, visores, luminárias e acessórios de circulação do ar faceando as paredes⁴⁹. As tubulações de fluidos e eletrodutos devem ser embutidas ou escondidas dentro de dutos técnicos desmontáveis⁴⁰.

Ao configurar a planta, o arquiteto deve reservar espaços suficientes para o sistema de acesso das pessoas e dos produtos (vestiários e antecâmaras), para o corredor de visitas a fim de que as mesmas não interfiram na produção, para os equipamentos de tratamento do ar¹⁷, que geralmente são volumosos, e para os dutos de insuflamento e de retorno de ar. É fundamental que o gerente do projeto saiba como estabelecer e conduzir o grupo durante as várias etapas.

Tratamento do Ar

O sistema de ar condicionado é complexo e constitui os parâmetros que regem o bom funcionamento da sala, tais como: temperatura, umidade relativa, capacidade de retenção dos filtros HEPA, insuflamento, fluxo de ar, etc.

O sistema de circulação e de tratamento do ar assegura a limpeza dos ambientes, pois alimenta as salas em ar filtrado e evacua os contaminantes nela emitidos.⁴⁰

O filtro é o componente mais importante do sistema. Ele assegura que o ar insuflado nos ambientes seja isento de contaminação. Para este fim, são utilizados filtros HEPA, caracterizados como “absolutos”.

A eficiência dos filtros HEPA varia de 99,997% para partículas de 0,5 μm a 99,9999% para partículas de 0,12 μm . Filtros HEPA podem também sofrer distinções na dependência de características de sua manufatura, sendo o tipo C, com eficiência para 99,99% para partículas de 0,3 μm , indicado para aplicação em áreas classe 100.000 (M 6,5, de acordo com o Sistema Internacional de Medidas) e classe 100 (M 3,5); tipo D, com eficiência de 99,999% para partículas de 0,3 μm para classe 10 (M 2,5); tipo F, com

eficiência de 99,999% para partículas de 0,2 a 0,1 μm para classe 1 (M 1,5). Níveis de controles mais rígidos, que não são no geral necessários para a área farmacêutica ou de correlatos, seriam possíveis com o emprego de filtros ULPA (Ultra Alta Eficiência de Filtração), com eficiência de 99,99999% ou melhor, no geral aplicáveis apenas à área eletro-eletrônica. Diferenciais de pressão, velocidade de fornecimento de ar, número ideal de trocas e a própria configuração e volume de sala serão fundamentadas ao considerar o ar ambiente ⁶⁵.

O ar filtrado pode ser distribuído de três maneiras: unidirecional, não unidirecional ou misto ^{35, 47}.

O fluxo unidirecional segue linhas paralelas de velocidade uniforme, desde o insuflamento até o retorno do ar⁴⁰; este movimento proporciona efeito pistão, ou de carregamento, que contribui para arrastar para as grelhas de retorno as partículas suspensas no ar, e além disso sendo as linhas paralelas, a contaminação não se propaga no ambiente. Este regime é utilizado para obter classes 1, 10 e 100. Geralmente exige cortinas laterais ou delimitações que garantam a característica laminar ao ar insuflado. Na maioria das vezes, este tipo de fluxo de ar é encontrado em áreas de tamanho menor, em que os produtos são expostos, merecendo cuidados especiais.

Os fluxos não unidirecional e/ou misto são escolhidos para as diversas salas onde o produto não será exposto, geralmente classes de 100 a 100.000. O fluxo não unidirecional indica turbulência e o fluxo misto, como o próprio nome diz, é constituído de uma porção laminar imediatamente adjacente ao local de insuflamento, tornando-se em seguida turbulento. Nos dois casos as partículas são espalhadas no ambiente e diluídas no volume de ar circulante, mantendo a concentração ou nível abaixo dos limites estabelecidos.

Na tentativa de se evitar a entrada de partículas ou contaminantes provenientes do meio externo adotam-se pressões diferenciadas entre salas vizinhas, ou seja, pressão positiva a partir da área mais limpa, de maneira que

ao abrir uma porta, naturalmente a corrente de ar impeça a penetração de elementos não desejáveis.

Distribuição de Fluidos de Processo

Geralmente o processo de produção de medicamentos torna necessário a disponibilidade de fluidos como água, ar comprimido e gases, indispensáveis para a fabricação dos produtos farmacêuticos. Da mesma maneira que para o ar, os fluidos não devem apresentar contaminação. Para isso os mesmos serão gerados limpos (água, vapor, ar comprimido) ou adquirido puros (gases) ⁴⁰.

Uma dificuldade que por vezes se apresenta é que, entre a geração de fluido limpo e o ponto de utilização existe o risco de contaminação do mesmo .

Portanto, devem ser considerados cuidados especiais com o sistema de distribuição, podendo incluir filtros terminais, tubulação desmontável para facilitar limpeza e esterilização e, no caso da água, esta não deve ficar parada, devendo o sistema funcionar em sistema de *loop*, sem permitir pontos mortos ou com falha de circulação.

Caso pertinente, devem ser considerados os requisitos específicos e mandatórios para fluídos que envolvem riscos ocupacionais (Hazard Production Material – HPM) ¹⁸. A pureza da água empregada é crítica, seja no sentido de material particulado como de pureza microbiana e ausência de endotoxinas bacterianas. ^{20, 41}

Limpeza

A manutenção dos níveis de limpeza de uma sala limpa em conformidade com seu projeto é uma das metas do controle de contaminação⁷, consistindo em desafio adicional o fato de baixos níveis de contaminação não

serem por vezes detectados em amostragens objetivando monitoramento ambiental, assim como na amostragem do produto para teste de esterilidade²⁴.

Limpeza e manutenção da mesma requerem o conhecimento de métodos e técnicas, assim como a disponibilidade de acessórios e suprimentos específicos, associados a procedimentos de inspeção e controle periódico.

Os suprimentos, acessórios e equipamentos deverão estar em conformidade com o processo e o produto, devendo incorporar a característica de limpeza, sanitização e esterilização, conforme pertinente antes de seu uso. No caso de esterilização a vapor a escolha de acessórios é limitada, já que no processo de autoclavação alguns componentes se danificam.

A escolha de itens auxiliares para a limpeza é difícil e normalmente confusa. O usuário, muitas vezes, encontra-se diante de incertezas na sua seleção, pois existem no mercado diversidade de características⁴⁰. A Prática Recomendada pelo IEST (Institute of Environmental Sciences and Technology)³⁹ descreve métodos de testes de pano de limpeza, tanto no que se refere à limpeza quanto à função.

Práticas anteriormente adotadas de fumigação ou de pulverização dos ambientes com agentes anti-sépticos são hoje consideradas obsoletas e inadequadas. Permanece porém a necessidade de seleção dos agentes de limpeza, os quais deverão ser não-iônicos, por permitirem baixo nível residual e apresentarem ausência de partículas, incluindo aqueles aquosos (ácidos ou alcalinos), com ou sem detergentes⁷. O processo de seleção deverá seguir os seguintes critérios: compatibilidade com o produto, processo, área limpa, ambiente e desinfetante (se aplicável).

A água de limpeza e/ou enxágue deverá estar no mesmo nível de pureza da água empregada ao processo, por exemplo deionizada, submetida a osmose reversa, destilada ou água para injeção (WFI). Na sala limpa asséptica requer-se normalmente água para injeção (WFI), ou estéril (SWFI). A frequência da troca de água é o fator primordial para redução da contaminação. Em Áreas Limpas Classe 1 - 1.000, a solução aquosa deverá ser

trocada a cada 30 metros quadrados, ou menos se alguma contaminação visível for percebida na solução. Para Classe 10.000 – 100.000 a troca dar-se-á a cada 50 metros quadrados, ou menos se alguma contaminação visível for percebida.

É importante ter em mente que os equipamentos e utensílios designados para limpeza de salas limpas são de utilização restrita às mesmas. Também é crucial a definição de responsabilidades e frequências, sempre respeitando as condições geográficas específicas ⁵⁵.

3.2 - Pessoal em Sala Limpa

Segundo DIXON, ²⁵ a força de trabalho do futuro será influenciada por aquela hoje disponível. O envelhecimento da classe trabalhadora, a mudança de valores, o horário flexível de trabalho, a falta de instrução, existência de normas, a limitação de movimentos, serão alguns dos fatores que estarão influenciando o futuro neste âmbito.

A motivação e moral são fatores fundamentais para o trabalho em áreas limpas. Existem cinco princípios de motivação: personalidade; reconhecimento / recompensa; envolvimento; comprometimento e lealdade.

Campanhas de sucesso criam ambientes nos quais a motivação é cultivada e próspera. Entretanto, o princípio do ambiente ser confinado não é suficiente para os trabalhadores atuarem em sala limpa e ambientes controlados. O problema maior gira em torno do escopo do trabalho, pois é limitado e a promoção é quase impossível. Tarefas que proporcionam ao trabalhador a identificação com o produto resultam em envolvimento e orgulho de suas realizações, necessidades básicas nem sempre preenchidas nas salas limpas ^{25, 40}.

Fatores ergonômicos também irão influenciar na motivação e moral dos operadores, o barulho é uma das principais causas de desconforto e o isolamento e confinamento contribuem para com a insegurança.

No entanto, alguns trabalhadores possuem metas e objetivos a realizar e alcançá-los. Portanto estas pessoas estão a caminho de uma melhor performance graças à motivação. Alguns trabalhadores almejam reconhecimento e consequente recompensa. Outros são motivados pela participação e envolvimento nas opiniões e decisões, o comprometimento promove a motivação, sendo inerente à atividade que o funcionário exerce na produção farmacêutica.²⁵ Certamente, item de impacto é a atitude tomada pela alta e média gerência ¹⁰.

3.2.1 - Treinamento

A obtenção de salas limpas pode seguir diferentes conceitos, no entanto apresenta um objeto comum de desempenho: “Proporcionar uma atmosfera ideal a qual irá proteger o produto do ambiente hostil” ²⁵. Neste caso, o ambiente hostil caracteriza a contaminação, cuja principal fonte é aquela oriunda do ser humano, e numa hipótese mais remota do próprio produto, já contaminado. Para minimizar a contaminação, o treinamento é um item essencial.

Em farmácias hospitalares, o treinamento relativo a manipulação asséptica empregando simultaneamente vídeo e instruções diretas ao vivo, mostrou-se o caminho ideal ²⁷, o que certamente será válido na indústria.

Durante o treinamento devem-se introduzir problemas reais do cotidiano do controle da contaminação. Para avaliar o efeito desse treinamento no desempenho do operador alguns métodos podem ser utilizados, tais como a investigação quanto ao atendimento aos satisfatórios procedimentos de operação, a técnicas próprias de vestimenta, de limpeza na área de trabalho, ou adotando testes escritos ou outras avaliações específicas de cada planta ou situação. Orientação quanto a paramentação constitui-se em abordagem indispensável ¹⁴.

Apresentações seguidas de questionários constituem-se em uma forma muito utilizada, porém mesmo assim, alguns operadores vêem o treinamento como ordem superior de seus chefes e não como algo de que realmente necessitam. Uma vez que o resultado não é imediato e demora a ser notado, pode ocasionar descontentamento por parte da direção, que por vezes descontinua o programa⁴⁰.

No entanto, o treinamento tende a se constituir em item essencial, e um bom programa de treinamento induz o operador no sentido do envolvimento, comprometimento e domínio de seu trabalho. Toda a estrutura gerencial da planta também deve estar comprometida com o treinamento. Deve-se assegurar que toda a força de trabalho entenda que a sala limpa é item fundamental para a qualidade do produto farmacêutico⁴⁰.

Há também que se considerar os aspectos da avaliação do treinamento dos operadores, através de distintos mecanismos. Entre as possibilidades deve-se considerar a participação satisfatória em exercícios de *Media Fill*, amostragens de superfícies de sua vestimenta, documentações relativas a observações quanto ao comportamento do operador^{9, 15}.

Existe documentação evidenciando dados surpreendentes obtidos no monitoramento de superfícies de áreas amostradas dos operadores durante programa envolvendo a investigação de contaminações. Foi detectada entre outras evidências, elevada contagem na mão esquerda de operador envolvido em operação manual de envase. Este e outros resultados obtidos por AVALLONE⁹ podem ser considerados indícios de treinamento inadequado.

De forma típica, amostragens de superfície constituem-se em recurso dos mais úteis e significativos na obtenção de informações relativas a flora, fontes de contaminação (em grande parte o elemento humano) e procedimentos dos operadores, desde a vestimenta até a operação nas específicas funções.

CUNDELL e COLABORADORES²², trabalhando com os dados de contaminação microbiana em áreas de enchimento asséptico de produtos

parenterais não observou relação entre o horário de amostragem de monitoramento ambiental e a frequência de limites de alerta obtidos na contaminação do ambiente (ar), superfície ou pessoal. Os autores puderam entretanto caracterizar níveis de frequência de alertas por 100 amostras em ordem decrescente, conforme segue: braço > vestimenta = piso > frasco de enchimento > luvas = ar > parede > máquina de enchimento. As frequências mais elevadas foram entre 15:00 e 16:00 horas, e sem variações sazonais, o que pode ser explicado pela uniformidade de condições no ambiente controlado.

3.3 - Certificação de Salas Limpas

O termo aplicável às salas é de “certificação” e não de “validação”, conforme por vezes se utiliza, pois o segundo termo se aplica a processos. Entendemos como certificação o conjunto de testes capazes de demonstrar que a sala limpa atende os critérios do projeto. Então, é realizada logo após a construção da sala, quando os testes são efetuados anteriormente e durante as operações, para verificar a obediência aos parâmetros especificados⁶⁴.

A certificação da área limpa será um dos aspectos importantes na validação do processo asséptico, e estará sem dúvida contribuindo para com os resultados a serem obtidos na execução de *Media Fill* ⁶¹. Também, um baixo nível de partículas ambientais estará sendo uma das características de processo desejáveis para que se obtenha, em produtos parenterais líquidos, o atendimento a especificação de material particulado⁶⁴. Vale entretanto a ressalva da distinta grandeza de tamanho de partículas nesta avaliação, e inclusive os instrumentos empregados na determinação, com os níveis de precisão adequados para partículas de ordem de grandeza de 10 e 15 μm ³¹.

3.3.1 - Testes Primários

Os testes primários são aqueles exclusivamente relacionados com a classificação da limpeza de ar quanto às partículas em suspensão, conforme a americana Federal Standard 209 E^{16, 28}.

Velocidade, Vazão e Uniformidade do Fluxo de Ar

O conhecimento destes parâmetros permite verificar se o sistema de ar está corretamente dimensionado e balanceado, e se o número de trocas de ar ou a velocidade do fluxo unidirecional são atendidos, assim como determinar se a vazão de ar fornecida e sua uniformidade são atendidas, para as áreas de fluxos não unidirecional e misto. Efetua-se uma primeira avaliação, e apenas quando os resultados estiverem em conformidade com o esperado prossegue-se com os testes seguintes¹⁶.

Vazamentos nos Sistemas de Filtragem

A verificação quanto a vazamentos visa confirmar que o sistema de filtros HEPA está instalado corretamente, sem vazamentos na estrutura de apoio, na fixação dos filtros e nos elementos filtrantes propriamente ditos. Os testes aplicados são chamados de avaliação de integridade e de estanqueidade. Permitem assegurar que o ar saindo dos filtros está perfeitamente limpo e que não estão sendo introduzidas partículas pelo sistema de tratamento de ar¹⁶.

Contagem de Partículas Totais em Suspensão no Ar

A contagem de partículas totais indica se o ar da sala limpa atende a classe de limpeza especificada. Não será realizado no geral, se os dois precedentes não apresentarem os resultados dentro do critério de aceitabilidade. O teste é efetuado com um contador de partículas totais ou não viáveis, conforme os procedimentos definidos⁴⁴. O resultado do teste indicará a concentração de partículas de um determinado tamanho por unidade de volume de ar^{16, 44}. Regiões de turbulência geradas no dimensionamento das partículas são cruciais para as determinações, independente de qual tipo de equipamento se empregue, mesmo em ambientes de fluxo unidirecional. Considera-se portanto indispensável a validação do dispositivo, podendo ser adotado o *Particle Challenge Test*⁴⁵.

Pressurização da Sala

O objetivo deste teste é verificar a capacidade do sistema da sala limpa em manter o diferencial de pressão especificado entre a sala limpa principal e as salas adjacentes. Deve ser realizado após a instalação ter atendido aos critérios de aceitação dos testes anteriores¹⁶.

3.3.2 - Testes Secundários

Os testes secundários são complementares aos primários e envolvem movimentação do ar e migração das partículas.

Paralelismo do Fluxo de Ar

Trata-se de avaliação específica para as salas ou zonas de fluxo unidirecional, e permite verificar se o ar se desloca em linhas de fluxo paralelas⁵⁷. Esta condição assegura que não haja contaminação migrando de um local para outro na mesma zona, e que todo contaminante gerado é imediatamente eliminado⁴⁰.

Integridade do Ambiente

O teste de integridade do ambiente é realizado para áreas de classe superior a 100, com este teste verifica-se através da contagem de partículas, a ocorrência ou não de entrada de ar não filtrado na sala em questão através de portas, passagens, frestas, etc¹⁶.

Recuperação

O teste de recuperação é realizado para determinar se uma sala limpa é capaz de retornar à sua classe de limpeza especificada, dentro de um espaço de tempo finito, após ter sido exposta brevemente a uma fonte de contaminação que é, para efeito do teste, apresentada em forma de fumaça ou outro aerossol opcional^{16, 67}.

Assim, o usuário pode saber quanto tempo precisa esperar antes de retornar às suas atividades⁴⁰.

Contagem de Partículas Sedimentadas

A contagem de partículas em superfície é utilizada para aquelas partículas de dimensões maiores, as quais estão fora da faixa de eficiência dos contadores ópticos, de partículas totais. Coletam-se então estas partículas por decantação natural, em uma placa apropriada, onde serão contadas por microscópios e/ou outros instrumentos apropriados¹⁶.

Testes Ambientais

Estes testes não têm relação com a limpeza do ar, mas devem ser realizados, caso o contrato com o projetista e o instalador assim determinem. Abrangem as seguintes avaliações: nível e uniformidade da iluminação; nível de ruído; nível e uniformidade da temperatura e da umidade relativa e nível de vibrações.

Todos os testes mencionados devem ser executados em diversas fases da implantação das áreas limpas. Em primeiro momento, eles devem ser realizados logo após a entrega dos locais pelo instalador, afim de comprovar os parâmetros do projeto tenham sido atendidos. Em seguida, os testes deverão ser refeitos após a instalação dos equipamentos de processo e a ativação dos fluidos e do processo produtivo, afim de investigar seu impacto sobre a contaminação dos ambientes. Enfim, os testes devem ser novamente realizados com o pessoal executando suas atividades, de forma a detectar as eventuais falhas inerentes aos procedimentos. A tabela 1, a seguir, mostra os testes recomendados por tipo de sala limpa.

Tabela 1: Relação de testes recomendados para salas limpas com fluxo unidirecional, não unidirecional ou misto.

Testes recomendados	Fluxo unidirecional	Fluxo não-unidirecional	Fluxo misto
Vazão de ar, uniformidade	1,2,3	1,2,3	1,2,3
Velocidade do ar, uniformidade	1,2,3	0	0
Vazamento em filtros	1,2	1,2	1,2
Contagem de partículas em suspensão	1,2,3	1,2,3	1,2,3
Pressurização	1,2,3	1,2,3	1,2,3
Paralelismo	1,2	na	0 (1,2)
Infiltração por indução	1,2	1,2	1,2
Recuperação	na	1,2	1,2
Contagem de partículas sedimentadas	0	0	0
Nível de iluminação	1,0 (2,3)	1,0 (2,3)	1,0 (2,3)
Uniformidade de temperatura	1,2,3	1,2,3	1,2,3
Nível de ruído	1,2,3	1,2,3	1,2,3
Uniformidade da umidade	0	0	0
Vibração	0	0	0

0 - teste opcional, dependendo das exigências de processo

1 - teste apropriado para a etapa *as built*

2 - teste apropriado para a etapa *at rest*

3 - teste apropriado para a etapa *dynamic*

na - não aplicável

3.4 – Caracterização da Sala Biolimpa

Em certos tipos de atividade produtivas, tais como a produção de produtos farmacêuticos, correlatos e biotecnológicos, os riscos decorrentes da contaminação podem ser de origem biológica ou não, merecendo ênfase o aspecto da detecção e os meios de evitar a contaminação biológica ⁶⁵.

A terminologia empregada para as partículas biológicas viáveis é de contaminação biótica, que caracteriza-se pelas bactérias, fungos ou vírus. No que diz respeito a monitoração, prende-se a atenção a bactérias e fungos apenas.

As amostras empregadas nas monitorações ambientais podem ser obtidas por sedimentação, filtração, separação, inércia ou coletadas diretamente em placas contendo meio de cultura sólido ³³. Podem ser empregados amostradores de ar do tipo ativo, comercialmente disponíveis, dentre os quais STA, RCS, RCS plus, Anderson e Sartorius. Cada um deles se caracteriza por um período de amostragem relativamente curto e apresenta sensibilidade baixa para aqueles ambientes onde se espera níveis de contaminação extremamente baixos. Esta limitação tem se consistido em dificuldade adicional nos programas de validação de processo em sistemas confinados, do tipo *Isolators*. Nestes casos, amostragem passiva empregando placas de Petri contendo meio de cultura posicionadas em pontos estratégicos, e ainda mais frascos de boca larga contendo meio de cultura líquido, também em posições definidas, têm se mostrado o recurso mais adequado. O meio de cultura líquido apresenta vantagens na recuperação de microorganismos

quando submetidos a baixa umidade relativa, condição típica nos *Isolators* após a remoção do gás esterilizante ¹.

Conforme o GMP europeu, em pontos específicos da área, uma filtração de ar (fluxo de 6 m³/hora, durante 10 minutos, proporcionado 1 m³ de ar da sala sob operação) é usada para identificar microrganismos, após incubação por 48 horas a 30° C em meio Ágar Sangue, e outra filtração para detectar leveduras e bolores, a serem incubados por 96 horas a 22° C em meio Sabourand Dextrose. Os resultados das avaliações são fotografados e devem ser anexados ao relatório de certificação. Deve ser feita a identificação da diversidade microbiana, pois se encontrado microrganismo patogênico, este pode comprometer a qualidade da área ³⁸.

No caso de monitoramento ambiental são amplamente empregados os recursos de placa Rodac®, assim como de *swabs* ou zaragatoas. Uma preocupação inerente ao uso destes tipos de amostragem reside na potencial permanência de resíduos dos meios de cultura empregados, após a amostragem. O problema pode ser contornado com uma re-sanitização após a amostragem, permanecendo o fator de preocupação no caso dos *Isolators* ¹.

Em todos os casos as amostras são separadas e analisadas em momentos distintos, podendo ser contadas por métodos microscópicos ou após cultura. Neste caso a quantificação é não de microrganismos mas de unidades formadoras de colônias (UFC), permitindo inclusive a diferenciação em gênero e espécie dos microrganismos. Os métodos para determinar a concentração de microrganismos do ar envolvem técnicas trabalhosas e demoradas, e inclusive o emprego de instrumentos com baixo grau de automação.

É interessante ressaltar o desenvolvimento de um novo método de detecção e diferenciação *on line* entre as partículas presentes no ar, bióticas ou abióticas. Baseia-se na detecção paralela da luz laser dispersa em diferentes ângulos de detecção, e na determinação de parâmetros dependentes e independentes, quanto à composição e natureza química. Um dispositivo

modificador torna possível uma diferenciação óptica, detectável pelo *input* de energia no microrganismo presente. Este tem a sua forma geométrica alterada em decorrência da perda de água e da desnaturação proteica. Tais diferenças não são apresentadas por um aerosol abiótico, constituído de látex, e utilizado na calibração do sistema ³³.

Um bom controle ambiental deve ser delineado com a inclusão de testes de superfícies críticas quanto a qualidade microbiológica. Exemplos de superfícies a serem monitoradas incluem o piso, paredes, teto, equipamentos, utensílios e pessoal ⁹.

O programa de monitoramento ambiental não inclui apenas amostragem, mas também o acompanhamento e análise crítica dos resultados obtidos. A confiabilidade nos dados obtidos pode ser extremamente variável. Conforme AKERS ⁴, a variabilidade nas determinações empregando três métodos distintos chegou a 50%, tendo se constituído em causas potenciais a seleção do meio, o volume de ar amostrado, a dinâmica de interação com a sala limpa, a eficiência da recuperação, além da temperatura e tempo de incubação.

3.4.1. – Caracterização do “Bioburden” Ambiental e Humano

Cada indivíduo, portanto cada operador ou funcionário de área limpa, possui uma flora bacteriana específica em determinadas partes do corpo, entre elas nariz, boca, pele corpórea, órgãos genitais e cabelos ^{6, 23}. Características adicionais a serem consideradas na propagação destes microrganismos dizem respeito a escamação da pele, fragmentos de cabelo, gotículas de saliva ²³.

A flora é variável para pessoas distintas e esta característica, assim como o nível de atividade de cada elemento respondem em grande parte pela contaminação ambiental. Dentre os microrganismos, a maioria saprófitas, ressalta-se o *Staphylococcus aureus*, tipicamente patogênico, encontrado no

nariz ou garganta, na pele ou no cabelo, de aproximadamente uma em cada seis pessoas.

Minimiza-se a transferência dos contaminantes corpóreos para o ambiente com um comportamento adequado, e adotando vestimentas adequadas, preferencialmente em tecido de poliéster ou em não tecido (Tyvek®) ⁶.

Outro aspecto a considerar é a resistência do microrganismo as condições adversas, a baixos níveis de atividade de água e nutrientes, seja por formas de resistência do tipo esporulada ou por característica inerente à fisiologia da célula vegetativa.

Neste aspecto, é recomendável o emprego, em salas limpas, de ao menos dois agentes de desinfecção com princípios ativos distintos ⁷. Alternativas possíveis vêm sendo propostas, embora com produtos convencionais, tais como o formol, álcool, tensoativos quaternários de amônio, iodo, fenol, cloro orgânico e inorgânico, ácido paracético, glutaraldeído. Todos apresentam vantagens e desvantagens em sua aplicação⁷, tanto na abrangência de ação biocida, como em interações e possíveis ataques a superfícies. Encontram-se também relatos quanto a resistência adquirida pelos microorganismos com determinados desinfetantes, assim como outros tipos de alteração de resposta ²⁴.

FOARDE e DIXON ²⁹ apresentaram propostas de métodos laboratoriais para avaliar a eficácia da redução da carga microbiana de paredes e teto de salas limpas. O microrganismo escolhido para desafio, *Staphylococcus epidermidis*, é representativo da flora normal da pele, e foi inoculado em níveis entre 50 e 100 UFC/25m² e, quando submetido a duas técnicas de limpeza empregando detergente fenólico sofrem redução de no mínimo 90% (1 ciclo log) ⁴⁰.

A eficácia de sistemas de limpeza estarão influenciando os resultados de partículas totais, assim como daquelas viáveis. A avaliação dos resultados do monitoramento ambiental deve considerar valores preconizados,

de menos que 3 UFC/m³ de ar (equivalente a menos que 0,1 UFC/pé³ de ar) quando em situação de ambiente classe 100 (equivalente a M 3,5, considerando o Sistema Internacional de Medidas, adotado a partir da versão E do Federal Standard 209), menos que 20 UFC/ m³ de ar (equivalente a menos que 0,5 UFC/ pé³ de ar) quando em situação de ambiente classe 10.000 (equivalente a M 5,5, considerando-se o Sistema Internacional de Medidas) ⁶.

No caso de superfícies de equipamentos ou aquelas inerentes à estrutura da área, os valores a considerar são de 3 UFC ou de 5 UFC por placa de contato (Rodac®), cuja superfície varia de 24 a 30 cm², ou superfície equivalente caso adotado o recurso de swabs, respectivamente para ambientes classe 100 (M 3,5) ou classe 10.000 (M5,5). No caso de piso, em ambos os ambientes, o valor referência é de 10 UFC. Valores também de superfície, porém relativos a operadores, são de 3 UFC para luvas e 10 UFC para vestimentas (por placa), quando em classe 100 (M3,5); os valores passam a ser respectivamente 10 UFC e 20 UFC, quando em ambiente 10.000 (M5,5) ⁵³.

Tem se trabalhado, nos últimos anos, em propostas de harmonização entre orientações de *Guidelines* dos Estados Unidos e Europa, tentando minimizar o impacto por exemplo da diferença de limites de 1 UFC/m³, mais de três vezes mais rígido que 1 UFC/ 10 pé³, respectivamente presentes em documentos das duas origens. Ao se considerar aspectos já ressaltados das diferenças de amostragens, entre outras, a aparente discrepância passa a não ser relevante ⁴.

Deve-se ter em mente que, independente de orientações de distintas natureza, em pontos críticos de áreas onde se desenvolvam processos assépticos bem controlados, 90-95% das amostras tomadas irão apresentar resultados negativos quanto a contaminação ⁴. Estes valores devem ser considerados quando da definição dos limites de alerta e ação, nos procedimentos operacionais.

O monitoramento microbiológico é um dos itens a serem considerados quando da elaboração de um programa de Monitoramento

Ambiental³². Os *Tratados* e *Guias* emitidos por órgãos oficiais ou por associações não definem valores a serem obrigatoriamente adotados como limites. Estes devem ser baseados em dados históricos, características das instalações e considerações inerentes ao produto em particular⁵².

Não menos importante é a definição de zonas de risco, em que o conceito denominado *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP) consiste em importante ferramenta, permitindo identificar aquelas etapas que são críticas para a segurança do produto. Esta análise requer um entendimento da área limpa, sua função, do fluxo de ar e da dispersão de contaminantes, bem como do próprio processo e do fluxo do produto, pessoal e materiais. Quando aumenta a intervenção manual, maior é a importância de um programa de monitoramento bem desenvolvido⁴⁶.

3.4.2. – Identificação dos Contaminantes Microbianos

Adicionalmente à quantificação das partículas viáveis presentes no ambiente, a caracterização posterior ao isolamento destes contaminantes é também de importância, sendo aspecto inerente à validação dos processos assépticos.

Vários são, porém, os problemas que se defrontam na iniciação de um programa de identificação de contaminação microbiana presente em uma área industrial farmacêutica. Os *Kits* para identificação microbiana rápida são desenvolvidos com o objetivo de identificar o material de origem clínica. Muitos dos microorganismos isolados do ambiente não reagem de forma idêntica por se constituírem de cepas mutantes, submetidas a não disponibilidade de nutrientes e condições ambientais adversas. Pode também ocorrer o isolamento de variedades não anteriormente identificadas.

Outro aspecto que incorpora dificuldade na identificação reside na identificação de fungos, com formas morfológicas distintas e diferentes estágios de reprodução¹¹. Estudo desenvolvido por ROBERTSON⁵⁸, tomando um total de 1116 amostras de ar ambiental (Bioaerossol) tomadas ao longo de nove

meses em 18 estados norte americanos, empregando aparelho de Andersen regulado para tempos de 2 a 5 minutos para ambientes internos e 1 a 3 minutos para ambientes externos permitiu, além da enumeração (de zero a 6.077 UFC/m³ para as 934 amostras internas e de zero a 12.668 UFC/m³ para as 182 amostras externas), a identificação das bactérias e fungos isolados. Os contaminantes que se distinguiram como os de ocorrência mais freqüente no ambiente externo incluíram *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Alternaria* sp e *Curvularia* sp, além de leveduras e bactérias em menor proporção. Nas amostragens obtidas de ambientes internos os microorganismos isolados com maior freqüência incluíram: *Cladosporium* sp, *Penicillium* sp, *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp, *Geotrichum* sp, *Curvularia* sp, *Fusarium* sp, *Epicoccum* sp, *Drechslera* sp, *Acromonium* sp e *Phoma* sp e com menor freqüência leveduras e bactérias⁵⁸.

Estas informações devem ser consideradas a luz do conhecimento de que, na flora microbiana do pessoal, extremamente importante no contexto, estarão prevalecendo bactérias, principalmente cocos Gram positivos, mas também bacilos Gram negativos e leveduras, na dependência de hábitos de higiene dos mesmos. Também das técnicas de limpeza e desinfecção, em que na decorrência do emprego da água estará de forma especial preocupando a presença de bacilos Gram negativos³⁶.

4 - MATERIAL E MÉTODO

4.1 – Material

Teve-se como material de estudo no presente trabalho as partículas, viáveis e não viáveis, amostradas em ambientes limpos ou áreas limpas (Classes A1, A2, A3 e A4), assim como partículas viáveis presentes em superfícies contidas nas mesmas áreas.

Apresenta-se no quadro 1, um exemplo de croqui evidenciando as áreas consideradas, correspondente a situações de Qualificação e Rotina 1 e, num outro momento como Qualificação e Rotina 2, e os respectivos pontos de amostragens considerados.

Este material foi submetido a avaliação em duas etapas básicas, a de Amostragem e Quantificação de Partículas, que considerou a amplitude do material inicialmente descrito, e a de Identificação dos Microrganismos Contaminantes, para a qual apenas as partículas viáveis foram consideradas.

4.2 – Método

4.2.1 – Amostragem e Quantificação de Partículas

O Método abrangeu um Programa de Monitoramento Ambiental, e foi iniciado imediatamente após ter sido finalizado o acabamento de etapas de edificação.

No primeiro momento (Qualificação 1) trabalhou-se segundo o Federal Standard 209 E em fase *at rest*. No segundo momento (Qualificação 2) seguiu-se a recomendação do Institute of Environmental Sciences and Technology – Contamination Control Division, nas seguintes situações: Sala limpa *as built*, sala limpa *at rest* e sala limpa em operação ou *dynamic*.

Na fase *as built*, o programa de monitoramento ambiental se inicia com as atividades de limpeza prévia, a fim de remover a sujeira mais pesada utilizando detergentes e acessórios apropriados. As normas de limpeza ainda não são extremamente rígidas, pois ainda serão instalados equipamentos, o que gera contaminação. Ainda nesta fase devem ser verificadas a qualificação da instalação e a qualificação da operação do sistema de ar condicionado.

Na fase *at rest*, o programa de monitoramento ambiental envolveu um maior número de atividades, entre as quais a Qualificação da Área. Tal qualificação consistiu na geração de provas documentais de que o sistema de ar condicionado trabalha de maneira consistente, em conjunto com os procedimentos de limpeza, assepsia, vestimenta, entre outros, para assegurar um ambiente apropriado para a fabricação de produtos estéreis.

A Qualificação da Área envolveu a determinação de uma matriz de amostragem (Grid) seguindo-se normas internacionais, particularmente o Federal Standard 209E (Airborne Particulate Cleanliness Classes in Cleanrooms and Clean Zones)²⁸ e IEST (Institute of Environmental Sciences and Technology)³⁹. A determinação foi feita levando-se em conta a área da superfície de cada sala ou região a ser estudada, assim como sua classificação teórica em termos de concentração de partículas. A área da superfície de cada sala foi dividida de maneira imaginária em quadrados de tamanhos iguais (Tabela 2), o que corresponde ao *Grid*. A amostragem foi geralmente realizada no centro de cada quadrado, no entanto ocorreram casos em que algum fator limitante ou alguma razão técnico-científica determinou que a amostragem fosse deslocada para um dos cantos do quadrado imaginário.

Desta maneira foi possível coletar uma amostra de cada quadrado, a fim de se ter uma idéia do número de partículas não viáveis presentes em toda a área, e até mesmo partículas viáveis (microrganismos), classificando-a.

Não se mantém, na análise dos dados, permanentemente a identificação das salas, entretanto respeitou-se sempre a classe a que pertencia cada ponto de amostragem.

Dois tamanhos de partículas são selecionados para o monitoramento, 0,5 e 5 μm , seguindo as normas internacionais.

Tabela 2 – *Grid* de divisão das salas limpas. A Tabela indica a classificação das salas limpas, área total, área ocupada e área líquida, a qual foi dividida gerando o número de pontos a serem amostrados de acordo com o Federal standard 209 E e IEST, também descritos.

Sala	Classe			Área Total m ²	Área Ocupada m ²	Área Líquida m ²	#Pontos Amostra		Obs.
							209E	IEST	
252 Pré Esterilização	A4	100000	6,5	118,9	0,0	118,9	5	14	
252 - CAP Pré Esterilização (Parede)	A1	100	3,5	6,8	0,0	6,8	3	19	
252 - CAP Pré Esterilização (Cortina)	A1	100	3,5	8,6	0,0	8,6	4	24	
253 Esterilização	A2	10000	5,5	93,8	0,6	93,2	11	15	
253 - LFHEsterilização (Cortina)	A1	100	3,5	12,7	0,0	12,7	6	36	
253 - LFHEsterilização (Parede)	A1	100	3,5	10,7	0,0	10,7	5	30	
256 Corredor	A2	10000	5,5	44,6	0,3	44,3	6	8	
260 Cristalização	A2	10000	5,5	361,9	5,2	356,7	41	58	
260 Cristalização - Equipamentos	A2	10000	5,5	NC	NC	NC	—	11	1
262 Dissolução	A4	100000	6,5	284,6	0,0	284,6	11	32	
262 Dissolução - Equipamentos	A4	100000	6,5	NC	NC	NC	—	3	2
262 - CAP Dissolução (Cortina)	A1	100	3,5	7,6	0,0	7,6	4	22	
262 - CAP Dissolução (Parede)	A1	100	3,5	2,0	0,0	2,0	2	6	
265 Head Tanks	A4	100000	6,5	187,6	0,0	187,6	7	21	
265 Head Tanks - Equipamentos	A4	100000	6,5	NC	NC	NC	—	2	3
266 Pass Through (out)	A4	100000	6,5	23,0	0,0	23,0	2	3	
267 Pass Through (in)	A3	100000	6,5	23,0	0,0	23,0	2	4	
270C Pré Gowing	A4	100000	6,5	11,8	0,0	11,8	2	2	
270B Gowing In	A3	100000	6,5	20,1	0,1	20,0	2	4	
270A Gowing AC	A3	100000	6,5	22,9	0,1	22,8	2	4	
270D Gowing Out	A4	100000	6,5	11,8	0,1	11,7	2	2	
Totais	—	—	—	1252,5	6,4	1246,1	117,0	320,0	

Notas

* Área Ocupada = área ocupada por equipamentos e fluxos laminares
A área de lavagem não é classificada e não será monitorada

1 – Pontos de contato em equipamentos críticos como *Isolators*, tanques e filtros secadores.

2 – Tanques, próximo aos bocais de carga

3 – Tanques, próximo aos bocais de carga

M – Sistema Internacional de Medidas

NC – não considerado

A quantificação das partículas viáveis impõe a necessidade de incubação dos meios de cultura posteriormente a amostragem, de forma a permitir a visualização das colônias provenientes da amostra coletada. Todas as placas para contagem de partículas viáveis foram incubadas a 20-25°C por 2 dias e 30-35°C por mais 3 dias, totalizando 5 dias de incubação, em estufas previamente certificadas.

O meio de cultura utilizado neste trabalho foi o Agar Caseína Soja (Difco) acrescido de 0.1% de Lecitina de Soja e 0.7% de Tween 80 para a inativação de possíveis resíduos de sanitizantes, e 10 ml de Penicilinase por litro de meio preparado para a inativação de possíveis resíduos de antibióticos cefalosporínicos.

O meio foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Foram pesados 40 g do pó, 1 g de lecitina de soja e 7 g de Tween 80 num balão de fundo chato com capacidade de 2 litros. Todos os ingredientes (exceto a Penicilinase) foram solubilizados em 1 litro de água quente (WFI – Water for Injection) e fervidos até a completa dissolução. Em seguida os balões preparados foram colocados em autoclave previamente validada para esterilização. O ciclo de autoclavação consistiu de três fases: Pré aquecimento, tempo necessário para a câmara toda atingir 121°C; Exposição ou Esterilização, trinta minutos a 121°C e 15 libras de pressão; e resfriamento, tempo para queda de pressão e diminuição da temperatura.

A Penicilinase foi testada anteriormente à sua adição no meio Agar Caseína Soja, utilizando o seguinte método: Foram preparados 5 frascos contendo 100 ml de Caldo Caseína Soja e 5 frascos contendo 100 ml de meio Tioglicolato Fluido de acordo com as instruções do fabricante (Difco), e em

seguida esterilizados em autoclave. Um frasco de Caldo Caseína Soja e um frasco de meio Tioglicolato Fluído foram separados e identificados como “controle negativo dos meios de cultura”. A um segundo frasco de Caldo Caseína Soja e a um segundo frasco de meio Tioglicolato Fluído foi adicionado 1 ml de Penicilinase na concentração de 20.000 Unidades de Levy/ml e identificados como “controle negativo da Penicilinase”. A um terceiro frasco de Caldo Caseína Soja e a um terceiro frasco de meio Tioglicolato Fluído foi adicionado, através de uma seringa estéril acoplada a um filtro de 0.22 micra (filtração esterilizante, utilizando Millex®), 1 ml de uma solução previamente preparada na concentração de 300 mg/ml de Penicilina. Estes frascos foram identificados como “controle negativo da penicilina”. A um quarto frasco de Caldo Caseína Soja e a um quarto frasco de meio Tioglicolato Fluído foram adicionados volumes de 1 ml da suspensão do microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, previamente preparado partindo-se de um liofilizado disperso e incubado em Caldo Caseína Soja a 30-35 C por 24 horas, e posteriormente diluída em capela de Fluxo Laminar até a concentração de 1/1000 em água estéril. Estes frascos foram identificados como “*S. aureus*”. Ao último frasco de Caldo Caseína Soja e meio Tioglicolato Fluído foram adicionados 1 ml da solução de Penicilina, 1 ml de Penicilinase e 1 ml do microorganismo *S. aureus* diluído. Todos os 10 frascos foram incubados a temperatura de 30-35 C por 24 horas. Os frascos que não continham o microorganismo não apresentaram crescimento, demonstrando que o meio, a solução de Penicilina e a Penicilinase estavam estéreis, enquanto que os frascos que continham microorganismos apresentaram crescimento, demonstrando que os meios estavam viáveis para o crescimento, e também que a Penicilinase adicionada no último frasco foi capaz de inativar a Penicilina também adicionada a este frasco, facilitando assim o crescimento do microorganismo também adicionado a este frasco. Desta forma, extrapolando-se os resultados para o meio Agar Caseína Soja (meio sólido) foi possível checar se a quantidade de Penicilinase adicionada foi suficiente para inativar

possíveis traços de Antibióticos Cefalosporínicos, que eventualmente estariam nas superfícies testadas com as placas Rodac®.

As amostragens de partículas viáveis foram determinadas tanto em amostragens de ar como de superfícies representativas de equipamentos e piso.

A determinação das quantidades de partículas não viáveis e viáveis envolveu técnicas específicas, sendo do tipo ativa quando do ar e passiva quando de superfícies e do ar.

A amostragem ativa implicou na sucção de um determinado volume de ar por um equipamento, destinando-se a contagem de partículas não viáveis e viáveis. A amostragem passiva para amostras do ar teve por finalidade a avaliação qualitativa de partículas viáveis do ar. Não envolveu equipamentos, tendo sido obtida com as placas contendo meio de cultura permitindo sedimentação gravitacional durante o período de 4 horas.

As tomadas de amostras foram efetuadas em pontos previamente definidos, em *grids* de espaços geométricos. Ocorreram em momentos de repouso, *at rest*, e sob operação *dynamic*, em áreas limpas sob processo de certificação, destinadas a produção de antibióticos cefalosporínicos. Diferentes classes ambientais foram consideradas: A1, A2, A3 e A4.

Na fase de repouso realizou-se a amostragem ativa de ar para partículas não viáveis, e na fase dinâmica as amostragens ativa de ar para partículas não viáveis, ativa de ar para partículas viáveis e amostragem de superfícies.

Amostragem ativa de ar para partículas não viáveis

Realizada empregando equipamentos com sensores capazes de contar partículas de determinados tamanhos, providos de impressoras, das marcas Biotest e MetOne.

O contador de partículas da marca Biotest, modelo APC 1000, utilizado em parte deste trabalho (Primeira Qualificação e respectiva rotina) é provido de um diodo a laser, classe IIIb, o qual trabalha na faixa de 20 mW em comprimento de onda de 820 nm e vazão de 0,1 pé cúbico por minuto. Em todas as posições foi amostrado um volume correspondente a um pé cúbico, o que demandou o tempo de amostragem de 10 minutos. O modelo APC 1000 faz a contagem simultânea de partículas nas dimensões de: 0,3, 0,5, 1,0 e 5,0 μm , no entanto foram escolhidos apenas os tamanhos 0,5 e 5 micra para a investigação e avaliação dos resultados.

O contador de partículas da marca MetOne, modelo 3113, utilizado na segunda qualificação e respectiva rotina, é provido de um diodo a laser e uma coleção de *optics* para a detecção de partículas. As partículas dispersam a luz proveniente do diodo, que converte os raios de luz em pulsos elétricos. A altura do pulso é proporcional ao tamanho da partícula. Os pulsos são contados e a amplitude é traduzida por tamanho de partícula. Resultados aparecem no *display*, como contagens de partículas de tamanhos diferentes (modo de contagem diferencial), ou como contagem total (modo de contagem cumulativa). Um microprocessador controla todas as funções do equipamento. A vazão é de 1 pé cúbico por minuto, e a amostragem com este equipamento é de apenas 1 minuto. O equipamento MetOne faz a contagem simultânea dos seguintes tamanhos de partículas: 0,3, 0,5, 1, 5 e 10 micra, no entanto foram escolhidos apenas os tamanhos 0,5 e 5 μm para a apresentação e avaliação dos resultados.

Amostragem ativa de ar para partículas viáveis

Neste trabalho foi utilizado um amostrador de impacto da marca PBI, modelo SAS Super 90. Este equipamento é capaz de succionar diversos volumes de ar, no entanto foram escolhidos os volumes de 1000 litros de ar para amostragens nas posições dentro dos fluxos laminares (área A1) e 500

litros de ar para amostragens nas posições restantes (áreas A2, A3 e A4). A operação consistiu em inserir placas Rodac® individualmente no equipamento e, dependendo do ponto de amostragem succionar volumes de ar, o qual impacta na superfície desta placa contendo meio de cultura Ágar Caseína Soja. Em seguida a placa Rodac é retirada e incubada, seguida da contagem das colônias (UFC). Esta operação foi realizada para cada ponto de amostragem na fase “em operação” ou *dynamic*.

Amostragem passiva de ar para partículas viáveis

Consistiu na exposição de placas de Petri contendo meio de cultura por 4 horas, seguida de incubação.

Amostragem de superfícies para partículas viáveis

Realizada empregando placas de contato (Rodac®) contendo meio de cultura, para o contato com a superfície a ser amostrada, por um período de tempo de aproximadamente 5 segundos sob leve pressão. Após o período de incubação procedeu-se a contagem das colônias (UFC).

4.2.2 - Identificação dos microrganismos contaminantes

A identificação dos microrganismos obtidos na amostragem de contaminantes de superfícies (Rodac®) foi efetuada empregando equipamento BioMeriëux Vitek®, que consiste em um sistema automatizado empregado na identificação de bactérias e fungos. As unidades de leitura são conhecidas como cartões, cujas respostas bioquímicas permitirão leituras específicas em variações colorimétricas e de turbidez.

Empregou-se nesta etapa do trabalho o seguinte material auxiliar:

- solução fisiológica 0,45% estéril
- tubos de vidro 11x12mm estéril
- ponteiros estéreis
- pipeta automática regulável
- água oxigenada (catalase)
- fita para o teste de oxidase
- equipamento Vitek®
- *swab* estéril
- colorímetro
- estante para tubos
- cartões Vitek : GNI - identificação de Gram negativos
GPI – identificação de Gram positivos
NHI – identificação de *Neisseria*/*Haemophilus*
ANI – identificação de anaeróbios
YBC – identificação de leveduras

Empregou-se ainda, na identificação dos microorganismos contaminantes, controles positivos que consistiram de cepas de bactérias e fungos, com ATCC (*American Type Culture Collection*) conhecido para referência.

Método

Ajuste do colorímetro

- Colocar um tubo com solução salina 0,85% dentro do colorímetro
- Verificar se está bem encaixado.
- A leitura deve marcar 100% transmitância. Para ajustar, utilizar o botão da direita.
- Retirar o tubo e proceder ao bloqueio da luz.

- Apertar o botão central do aparelho, a leitura deve marcar 10% transmitância. Para ajustar, utilizar o botão da esquerda.

Preparo dos cartões

Identificação dos cartões

O cartão é identificado por um total de sete dígitos, que permitem reconhecer a origem e a natureza da amostra.

Informações adicionais a serem incorporadas nos cartões

a) Bacilos Gram negativos

O resultado da reação de oxidase deve ser marcada nos cartões GNI no círculo do canto superior direito dos cartões citados.

Oxidase (+) – preencher o círculo

Oxidase (-) – não preencher o círculo

b) Cocos Gram positivos

O resultado da catalase deve ser marcada nos cartões GPI no círculo do canto superior direito dos cartões citados.

Catalase (+) – preencher a círculo (*Staphylococcus*)

Catalase (-) – não preencher a círculo (*Streptococcus*)

No caso de microorganismos catalase positiva (+), preencher o resultado da coagulase no espaço ovalado situado logo abaixo do círculo da catalase.

Coagulase (+) – preencher o espaço ovalado (*Staphylococcus aureus*)

Coagulase (-) – não preencher o espaço ovalado (*Staphylococcus* coagulase negativa).

No caso de microorganismos catalase negativa (-), preencher o resultado da beta-hemólise no espaço ovalado situado logo abaixo do círculo da catalase.

Beta-hemólise (+) – preencher o espaço ovalado (*Streptococcus* grupo A ou B, etc).

Beta-hemólise (-) – não preencher o espaço ovalado (*Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*).

c) Leveduras

Deve ser preenchido o círculo do canto superior direito se a leitura do cartão YBC for feita após 48 horas de incubação.

Inoculação dos cartões

GNI/GPI

- a. Retirar 1 a 2 colônias iguais, do meio de cultura com um swab estéril. As colônias devem ser de culturas recentes (24h). Não devem ser usadas colônias crescidas em meios contendo substratos bioquímicos (Rugai, ágar McConkey, citrato, etc.)
- b. Inocular a bactéria na solução salina contida em tubo de vidro e medir no colorímetro. Cada bactéria tem a sua cor correspondente (verificar tabela no colorímetro) à turvação do inoculo.
- c. Ex.: BGN – faixa AZUL, CGP – faixa VERMELHA
- d. Colocar o tubo no suporte de plástico.
- e. Colocar o cartão numerado no suporte plástico onde está o cartão correspondente.

- f. Colocar o canudo de transferência (canudo de plástico azul) no cartão e na solução contendo o inóculo.
- g. Apertar o botão “ON” para ligar a câmara de vácuo e a seladora.
- h. Colocar a bandeja com os cartões na câmara de vácuo e apertar o botão “fill”. O sinal “READY” deve estar inicialmente ligado, e a seguir apagar quando estiverem sendo preenchidos os cartões. O sinal “READY” volta a aparecer quando o processo estiver finalizado.
- i. Abrir a vedação do sistema (porta).
- j. Verificar se o inóculo foi aspirado.
- k. Selar os cartões um a um, anteriormente a realizar o corte do canudo azul.
- l. Verificar se não ficou nenhuma bolha nos orifícios do cartão. Se isso acontecer bater levemente no canto do cartão, para levá-las ao local de depósito de bolhas.
- m. Abrir a porta do sistema de leitura e colocar o cartão na bandeja imediatamente a frente.

NHI/ANI

- a. Retirar 3 a 4 colônias do meio de cultura, com um swab estéril.
- b. Inocular em 1,8mL de solução fisiológica contida num tubo de vidro.
- c. Verificar a turvação no colorímetro. O inóculo deve estar na cor AMARELA.
- d. Proceder conforme descrito acima (itens c até k do item GNI/GPI).
- e. Antes de jogar o tubo com salina que restou no inóculo, colocar 1 a 2 gotas de H_2O_2 para verificar se a bactéria produz ou não catalase.
- f. Colocar os cartões em uma estufa a 37°C por 4 horas.

YBC

- a. Retirar 1 a 2 colônias iguais do meio de cultura, com um swab estéril.
- b. Inocular em 1,8mL de solução fisiológica.
- c. Verificar a turvação no colorímetro. A leitura do inoculo deve estar no **VERDE**.
- d. Proceder conforme descrito acima (de c até k item GNI/GPI)
- e. Incubar por 24horas e 48horas, quando necessário, em estufa a 30°C.

Cuidados e precauções importantes a observar durante o procedimento:

- 1. Os canudos azuis devem ser desprezados no lixo que vai se autoclavado.
- 2. Os tubos de vidro devem ser colocados no recipiente com água e sabão próprio.
- 3. Verificar se o inóculo foi aspirado em todos os cartões antes de selar os mesmos.
- 4. Nunca deixar os cartões após preenchidos em cima da bancada por mais de 20 minutos. colocar imediatamente na leitora.
- 5. Colocar os cartões de mesmo número (GNI) na mesma bandeja, não necessariamente em ordem seqüencial.
- 6. Se ao abrir a porta a bandeja a frente do sistema leitor estiver cheia, colocar os cartões naquela a esquerda.

Leitura dos cartões YBC e NHI

A interpretação do cartão NHI do Vitek® seguiu a seguinte orientação:

Quadro 2 – Interpretação do cartão NHI do Vitek®

Teste	Código do Teste	Reação		Comentários
		Positiva	Negativa	
1	ALA	Amarelo	Amarelo bem pálido ou claro	Cores amarelo fracas ou pálidas são negativas. Somente amarelos bem definidos são considerados positivos. Se houver dúvida deixar uma (?) no lugar.
2	OPS			
3	PRO			
4	GGT			
5	GLY			
6	LYS			
7	ONPG			
8	PHN			
9	GLU	Amarelo ou laranja claro	Vermelho ou laranja escuro	Somente considerar como positivo os resultados amarelos ou laranja claro outras cores considerar duvidoso (?)
10	SUC			
11	MLT			
12	TTZ	Vermelho ou Rosa em todo o orifício	Claro ou um pequeno precipitado em torno da parede do orifício	Uma pequena formação vermelha na parede do orifício ou um precipitado é considerado negativo
13	RES	Rosa forte, Violeta avermelhado ou malva	Roxo ou azul escuro	Uma cor rosa ou roxa avermelhada é considerada como positiva. Roxo é negativo
14	ORN	Vermelho ou vermelho alaranjado	Amarelo, amarelo alaranjado ou laranja claro	Se o teste 1 e 2 forem positivos e houver dúvida na interpretação da cor colocar como positivo ou então uma (?)
15	URE	Vermelho	Amarelo ou laranja pálido	Somente uma cor vermelha é positiva. Sombreados de laranja, considerar negativo
16	PEN	Amarelo ou amarelo esverdeado	Roxo, azul escuro ou marrom	Qualquer cor amarelada significativa deve ser considerada como positiva

Leitura dos cartões YBC

a) Após o período de incubação colocar o cartão YBC na leitora. O cartão deve ser colocado na bandeja que vai ser lida a seguir, portanto a bandeja que estiver à direita quando se abrir a porta.

b) Se o período de incubação não for suficiente, o Vitek® vai soltar um relatório avisando que o cartão deve ser incubado por mais 24h.

c) Após esse período de incubação retirar da estufa, preencher o círculo do canto superior direito do cartão (indica leitura com 48h) e introduzir no sistema leitor.

d) Colocar o cartão na bandeja que vai ser lida a seguir, e não na que esteja à frente da abertura da porta.

Computador

Funcionamento Inicial

O sistema Vitek® possui dois programas, o ims e o ams. O primeiro gerencia os dados obtidos pela leitura dos cartões, e o segundo une as informações da origem e natureza das amostras com as leituras dos cartões.

a) Se o computador estiver com a tela apagada apertar a barra de espaço.

b) Se na tela estiver escrito ims>, digitar ims[ENTER]

c) Vão aparecer as palavras;

Login: (digitar a identificação individual) [ENTER]

Password: (digitar a senha individual) [ENTER]

Nota: Se o computador estiver fora do sistema digitar fsck-s

d) Aparece o MENU de opções de ims (de 1 a 16)

e) Para seleccionar algum dos itens é só colocar a identificação desejada, [ENTER]

f) Para entrar no ams, é só digitar, ams [ENTER]

g) Para voltar para o ims estando no ams, digitar ims ou utilizar o comando [CTRL [D]

Sistema AMS (amscomd>)

É a parte do sistema que gerencia os dados provenientes das leituras dos cartões.

Comandos do AMS e suas utilidades:

help – aparece a lista de todos os comandos do ams.

Seguem os comandos mais utilizados e suas funções:

amsep – informa as condições de trabalho do sistema, a temperatura da incubadora, a bandeja que será lida e em que horário.

dir a – mostra todos os cartões que estão no momento na bandeja a, em que posição estão e quanto tempo têm de leitura.

dir b – mostra todos os cartões que estão na bandeja b, em que posição estão e quanto tempo têm de leitura.

Nota: Para prosseguir assim com as outras bandejas basta alterar a identificação.

message – deve ser digitado quando o aparelho emitir um sinal sonoro. Serve para alertar um problema com a leitora ou com algum cartão.

mdir – usar quando a mensagem que aparecer indica que existe um cartão em que a leitora não entendeu o número. A correção é feita usando este comando mais a letra em que esta o cartão.

Nota: As correções dos números dos cartões podem ser corrigidas manualmente, caso detectado erro (não pelo equipamento). Para fazer a correção deve se retirar o cartão, limpar o número com um swab embebido em

álcool e escrever novamente o número. Esta correção manual pode ser feita apenas até a primeira hora de leitura.

irep - mostra um relógio individual de cada cartão contido em uma bandeja. Provas bioquímicas, entre outras informações.

ani – programa para leitura de cartões ANI para identificação de anaeróbios.

nhi – programa para leitura dos cartões NHI para identificação de *Neisseria/Haemophilus*.

gn – Gram negativos

gp – Gram positivos

Sistema IMS

O sistema ims irá realizar os estudos estatísticos tendo por base as informações fornecidas ao computador ou nele armazenadas.

Cadastro da Amostra

No MENU principal do IMS, digitar 1.

Specimen n.º: [ENTER]

O sistema vai perguntar se é um novo material, [ENTER]

Material: colocar a sigla correspondente ao material

Localização/material: colocar a localização de onde foi retirado o material

Data da coleta: colocar a data de coleta do material

[CTRL][X]

N.º do cartão: colocar o número que foi colocado no cartão sem o dígito.

Teste n.º: colocar 1 [ENTER]

Tipo de teste: colocar o tipo de cartão que será usado

N.º da cepa: colocar o número do dígito

Etapa do teste: digitar "P" [CTRL] [X]

Microorganismo: colocar a sigla correspondente ao microorganismo.

Modificar o resultado: digitar “y”

Quando finalizado o processo de cadastro, [CTRL] [B].

Apagar informações desnecessárias do banco de dados.

Resultados

Opções entre as identificações

Em algumas situações as identificações realizadas pelo sistema deixam uma margem de dúvida. O resultado aparecerá com porcentagens muito próximas de dois microorganismos. Significa que o sistema não conseguiu fazer a diferenciação e espera que o usuário faça a decisão.

Estes cartões ficam no “Review Temporary Results”

- a) Selecionar o item 5 do MENU principal
- b) O sistema vai perguntar se quer que seja impresso a lista de todos os cartões contidos nesta seção.
- c) Digitar “y” quando a lista é grande, o que irá permitir visualizar os resultados de todos os cartões com problemas.
- d) Colocar o número dos cartões nos quais é preciso fazer a opção.
- e) Digitar “s”
- f) Escolher o item que corresponde ao microorganismo correto.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grau de segurança que se possa atribuir quanto à estabilidade do produto é muito melhor definido ao se considerar processos em que se possa incorporar a esterilização terminal do produto, com SAL (Sterility Assurance Level) de no mínimo 10^{-6} . Entretanto, são frequentes as limitações que impedem esta alternativa, como degradação, redução da meia vida do produto, formação de partículas, alteração de cor e agressão à integridade dos frascos e tampas utilizados.

Aspecto de maior relevância ao se considerar a degradação seria a segurança, em decorrência de características de toxicidade, teratogenicidade e mutagenicidade que possam ser provenientes de degradação dos produtos, incluindo a quebra da molécula do fármaco, ou de sistema conservante⁵⁴.

Em decorrência do desafio, e da dificuldade em se comprovar SAL adequado para produtos estéreis obtidos através de processos assépticos, foram desenvolvidos projetos envolvendo sistemas robotizados, e os sistemas *Isolators*, comercialmente disponíveis. Modelos matemáticos, e critérios mais rígidos para a execução do teste e interpretação dos resultados do exercício de *Media Fill* têm levado a projeções de valores de SAL de 10^{-6} para processos assépticos, ao invés do valor de 10^{-3} que os caracteriza^{12, 68}.

Muitas evoluções têm ocorrido, inclusive com a aplicação do conceito de *Steam Sterilization In Place Technology*³.

A contaminação microbiana que venha potencialmente a ocorrer num processo asséptico convencional é função de muitas variáveis

envolvidas no processo de envase do produto: planejamento da área de enchimento, velocidade do ar, procedimento de sanitização, número de partículas não viáveis e viáveis, esterilização do equipamento, esterilização do produto, tamanho de abertura do frasco para acondicionamento, tempo que o frasco permanece exposto ao ambiente, treinamento do pessoal em técnicas assépticas⁵.

Entre as potenciais fontes de contaminação, selecionou-se aquelas decorrentes do ambiente produtivo. Assim, procedeu-se a obtenção de dados de partículas não viáveis de 0,5 e 5 µm assim como de partículas viáveis provenientes do ar (ambiente) e superfícies (Rodac®), sempre buscando respeitar o melhor possível as localizações geográficas.

Os fatores de variação considerados no estudo foram:

- Classe: locais com distintas exigências de qualidade ambiental, conforme critérios do Federal Standard 209 E²⁸ e IEST³⁹. A classificação é realizada em função do número de não viáveis, viáveis no ar e Rodac (Tabela 3). Cada classe foi representada por distintas salas e cada sala por distintos pontos de coleta.

- Momento: Antes e Após sanitização

- Movimento no laboratório: dinâmico e em repouso.

- Datas: foram realizadas coletas em diversas datas

Os resultados obtidos neste trabalho correspondem aos momentos da qualificação e certificação das salas limpas, e também posterior monitoramento de rotina. Para uma primeira avaliação foram considerados os limites de procedimentos internos cedidos por uma empresa multinacional da área farmacêutica.

Tabela 3 – Classificação das salas em função do número de não viáveis, viáveis no ar e Rodac®

Partículas não viáveis				
Área	Condição estática (#/pé³)		Condição dinâmica (#/pé³)	
	Tamanho de partícula		Tamanho de partícula	
	0.5 µm	5 µm (informativo)	0.5 µm	5 µm (informativo)
A1	---	---	100	0
A2	100	0	10000	56
A3	10000	56	100000	566
A4	100000	566	---	---
Partículas viáveis no ar				
Área		Número de CFU x m³		
A1		< 1		
A2		< 10		
A3		< 20		
A4		< 87		
Rodac				
Área		Número de CFU x placa de 55 mm de diâmetro		
A1		< 1		
A2		< 5		
A3		< 25		
A4		< 50		

Embora o trabalho tenha contemplado quatro momentos, sendo respectivamente Qualificação e Rotina 1 e Qualificação e Rotina 2, em decorrência da ausência de dados de partículas viáveis e de poucos dados de partículas não viáveis no momento denominado Qualificação 1, a análise estatística não abrangeu os resultados gerados neste momento.

A avaliação estatística dos resultados foi efetuada, para a racionalização do trabalho, em segmentos distintos, sendo que o primeiro consistiu em avaliar os resultados provenientes do momento Rotina 1; a seguir, procedeu-se a avaliação dos resultados gerados no momento Qualificação 2, então a avaliação dos resultados provenientes do momento Rotina 2 e, por fim um estudo dos microorganismos presentes por classe de sala limpa.

Procedendo-se a monitoração de acordo com o Federal Standard 209 E, considera-se somente a contagem de partículas não viáveis, enquanto que a United States Pharmacopeia, Chapter <1116> considera também as partículas viáveis, ou seja, contaminação microbiana como parâmetro para classificação das salas limpas. Porém, embora a correlação entre contaminação de partículas não viáveis e viáveis tem sido debatida durante anos, não se tem ainda um consenso sobre o assunto^{2, 4, 28}.

5.1 – Análise Estatística de “Rotina 1”

Neste momento, os resultados avaliados foram gerados em classe A2.

Para analisar a correlação entre o número de partículas não viáveis 0.5 µm, número de partículas não viáveis 5 µm, número de partículas viáveis no ar e Rodac, trabalhou-se com dados coletadas em vários locais, segundo a Tabela 4.

Tabela 4 – Locais onde foram realizadas amostragens para contagem de partículas não viáveis de 0,5 e 5,0 µm, viáveis no ar e superfícies (Rodac®).

Análise	Locais
Não viáveis 0.5 micra	C1 a C8
Não viáveis 5 micra	C1 a C8
Viáveis	C1 a C7
Rodac	R1, R2, R3, R12, R13, R14, R15, 16,

Na Tabela 5 encontram-se medidas resumo das variáveis em estudo (mínimo, máximo, média e desvio padrão).

Tabela 5 – Medidas resumo das variáveis em estudo

Partículas	Locais	Mínimo	Máximo	Média	P
Não viáveis 0.5 μm	1	20	42515	5270	6564
	C2	0	18070	2947	3722
	C3	0	14690	3046	3084
	C4	0	3095	361	544
	C5	0	24350	823	3272
	C6	0	3365	802	780
	C7	0	4215	1147	967
	C8	0	1670	283	489
Não viáveis 5 μm	C1	0	145	17.0	25.1
	C2	0	125	10.8	19.6
	C3	0	70	11.1	17.2
	C4	0	42	6.2	8.3
	C5	0	80	16.3	19.2
	C6	0	130	20.8	27.9
	C7	0	95	7.4	17.9
	C8	0	10	0.5	1.8
Viáveis no ar	C1	0	32.0	1.0	4.4
	C2	0	10.0	0.6	1.8
	C3	0	15.0	1.3	3.0
	C4	0	20.0	0.7	2.9
	C5	0	17.0	1.1	3.1
	C6	0	36.0	2.1	5.2
	C7	0	98.6	10.1	18.9
Rodac	R1	0	9	0	1
	R2	0	22	1	3
	R3	0	223	7	33
	R12	0	11	1	2
	R14	0	236	6	32
	R15	0	325	10	47
	R16	0	312	8	43
	R13	0	79	2	11

DP = Desvio Padrão

A visualização dos dados permite, preliminarmente, apenas distinguir elevada ordem de grandeza para partículas não viáveis de 0,5 μm , comparativamente às de 5,0 μm , assim como viáveis. A distinção é entretanto

subjetiva, e para possibilitar a avaliação de correlações entre as variáveis em estudo foram realizados dois tipos de análise:

- Correlações entre locais (considerados individualmente).
- Correlações entre médias de todos os locais.

Como neste tipo de dados é comum a existência de valores extremos, trabalhou-se com o logaritmo (base 10) do número de partículas. Não sendo possível calcular o logaritmo de zero, os valores zeros foram substituídos por 0,1. Nota-se que esta substituição não invalida as análises, já que os valores obtidos foram muito maiores aos substituídos.

Correlações entre locais

Na Figura 2 observam-se as correlações entre locais para o número de partículas não viáveis. Como o número de correlações (considerando os locais aos pares) é muito grande, só será feita uma análise dos aspectos principais que se destacam no gráfico.

Figura 2 – Correlações entre locais do número de partículas não viáveis
(0,5 e 5,0 μm)

Na Figura 3 encontram-se as correlações entre locais de número de partículas viáveis e Rodac® entre si e também entre estas e o número de partículas não viáveis.

Figura 3 – Correlações entre locais do número de partículas viáveis e Rodac® e destas com o número de partículas não viáveis (0,5 e 5 μ m).

Correlações entre médias de todos os locais

Para se ter uma idéia um pouco melhor das correlações entre número de partículas (viáveis e não viáveis), foi feita a média do número de partículas entre salas (para cada tipo de partículas). A partir do logaritmo (base 10) destas médias, foram construídos os gráficos de dispersão da Figura 4. Na Tabela 6 encontram-se as correlações estimadas, os coeficientes de determinação, r^2 e os níveis descritivos da hipótese de inexistência de correlação entre os pares de variáveis. O coeficiente de correlação mede a porcentagem de variação da variável dependente (y) que é explicada pela variação da variável independente.

Figura 4 – Diagramas de dispersão do número médio de partículas viáveis e não viáveis (média entre locais)

Tabela 6 – Correlações entre o número médio de partículas viáveis e não viáveis (média entre locais)

Variáveis	R	r ²	P	Conclusão
Não viáveis 0,5 µm x 5,0 µm	0.7597	57.7%	0.0000	**
Não viáveis 0,5 µm x Viáveis no ar	-0.3832	14.7%	0.0039	**
Não viáveis 0,5 µm x Rodac	0.2005	4.0%	0.1421	NS
Não viáveis 5,0 µm x Viáveis no ar	-0.3666	13.4%	0.0059	**
Não viáveis 5,0 µm x Rodac	0.0531	0.3%	0.7004	NS
Viáveis no ar x Rodac	-0.2100	4.4%	0.1238	NS

** Hipótese significativa ao 1%

NS Hipótese não significativa

r Fator de correlação

p Probabilidade

5.2 - Análise Estatística da “Qualificação 2”

As medidas foram realizadas com um número grande de variáveis tais como sala, ponto, classe, sanitização, movimento e em vários dias, portanto não foi possível realizar um estudo incluindo todos os fatores de variação ao mesmo tempo.

Os resultados de contaminação obtidos após sanitização devem ser analisados tendo em mente tanto o efeito dos sanitizantes empregados (Peróxido de Hidrogênio 4%, Álcool Isopropílico 70% e LPH), assim como a possibilidade de cepas resistentes aos mesmos ³⁰.

A partir dos dados individuais foram calculadas as medidas resumo das Tabelas 7 e 8 (número de observações, média e desvio padrão) para as variáveis em estudo. Na Tabela 7 as medidas resumo foram calculadas por sala, tipo de sanitização, movimento da sala e classe, enquanto que na Tabela 8 foram considerados os fatores tipo de sanitização, movimento da sala e classe.

Tabela 7 – Medidas resumo das variáveis em estudo por sala, sanitização, condição e classe

Sala	Sanit	Cd	Clas	N				Médias				Desvio padrão			
				0,5	5	Viav	Rodac	0.5	5	Viav	Rodac	0.5	5	Viav	Rodac
253	Antes	R	A1	0	0	0	11				0.82				0.98
253	Antes	R	A2	0	0	0	6				3.33				1.86
256	Antes	R	A2	0	0	0	3				4.00				2.65
260	Antes	R	A2	0	0	0	37				17.68				45.15
270A	Antes	R	A3	0	0	0	2				9.00				0.00
270B	Antes	R	A3	0	0	0	2				6.00				2.83
252	Antes	R	A4	0	0	0	15				10.00				13.56
262	Antes	R	A4	0	0	0	18				56.11				80.40
265	Antes	R	A4	0	0	0	6				71.67				143.31
266	Antes	R	A4	0	0	0	2				0.00				0.00
270C	Antes	R	A4	0	0	0	2				7.00				1.41
270D	Antes	R	A4	0	0	0	2				5.50				0.71
252	Após	D	A1	24	15	0	0	0.08	0.00			0.28	0.00		
253	Após	D	A1	33	33	33	33	0.18	0.00	0.03	0.06	0.47	0.00	0.17	0.24
262	Após	D	A1	12	12	0	0	0.33	0.00			1.16	0.00		
253	Após	D	A2	18	15	18	18	64.89	1.13	1.67	0.39	106.76	1.36	2.85	0.78
256	Após	D	A2	9	9	9	9	124.0	1.56	1.78	1.00	82.99	1.01	2.73	2.29
260	Após	D	A2	111	111	111	111	217.42	0.64	0.76	1.79	350.27	1.15	5.04	6.26
266	Após	D	A3	0	0	6	0			0.00				0.00	
267	Após	D	A3	6	6	6	6	1.33	0.17	0.00	0.00	1.37	0.41	0.00	0.00
270A	Após	D	A3	6	6	6	6	166.00	3.33	3.33	0.83	143.63	1.75	3.01	1.17
270B	Após	D	A3	6	6	6	6	157.17	2.50	6.00	2.17	66.39	1.05	7.38	2.32
252	Após	D	A4	21	12	45	45	111.10	4.08	4.18	8.00	86.35	3.48	5.73	30.82
262	Após	D	A4	42	42	54	54	109.98	2.24	3.46	28.26	160.58	2.60	4.32	58.05
265	Após	D	A4	18	18	18	18	169.50	6.06	10.44	67.78	191.04	6.78	8.45	84.99
266	Após	D	A4	6	6	0	6	3.50	0.00		0.00	6.63	0.00		0.00
270C	Após	D	A4	0	0	6	6			2.33	3.00			2.94	4.34
270D	Após	D	A4	0	0	6	6			1.67	2.00			1.97	1.79
253	Após	R	A2	6	5	0	0	11.00	0.00			11.85	0.00		
256	Após	R	A2	3	3	0	0	12.67	0.00			2.89	0.00		
260	Após	R	A2	37	7	0	0	5.46	.76			8.48	.61		
267	Após	R	A3	2	2	0	2	0.50	0.00		0.00	0.71	0.00		0.00
270A	Após	R	A3	2	2	0	0	16.50	1.00			4.95	0.00		
270C	Após	R	A4	5	5	0	1	63.80	2.60		8.00	18.99	1.52		
270D	Após	R	A4	6	6	0	0	78.17	3.00			18.52	1.67		

Sanit = sanitização

Cd = condição

Clas = classe

0,5, 5 = não viáveis 0,5 e 5 μ m

Viav = viáveis

R = repouso

D = Dinâmico

Tabela 8 – Medidas resumo das variáveis em estudo por sanitização, Condição e classe.

Sanit	Cd	Clas	N				Média				Desvio padrão			
			0.5	5	Viav	Rodac	0.5	5	Viav	Rodac	0.5	5	Viav	Rodac
Antes	R	A1	0	0	0	11				0.82				0.98
Antes	R	A2	0	0	0	46				14.91				40.79
Antes	R	A3	0	0	0	4				7.50				2.38
Antes	R	A4	0	0	0	45				35.89				74.82
Apos	D	A1	69	60	33	33	0.17	0.00	0.03	0.06	0.59	0.00	0.17	0.24
Apos	D	A2	138	135	138	138	191.44	0.76	0.94	1.56	321.36	1.19	4.69	5.67
Apos	D	A3	18	18	24	18	108.17	2.00	2.33	1.00	115.85	1.78	4.52	1.68
Apos	D	A4	87	78	129	135	115.22	3.23	4.55	23.23	150.83	4.34	5.92	54.58
Apos	R	A2	46	45	0	0	22.74	0.62			17.90	3.28		
Apos	R	A3	4	4	0	2	8.50	0.50		0.00	9.68	0.58		0.00
Apos	R	A4	11	11	0	1	71.64	2.82		8.00	19.29	1.54		

Sanit = sanitização

Cd = condição

Clas = classe

0,5, 5 = não viáveis 0,5 e 5 μm

Viav = viáveis

R = repouso

D = dinâmico

Para permitir melhor visualização das tendências, os resultados médios das Tabelas 7 e 8 foram empregados na construção dos gráficos de dispersão da Figura 5 e os gráficos de perfil da Figura 6.

Figura 5 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de contaminação nas diferentes situações (a partir de dados da Tabela 7).

Figura 6 – Gráficos de dispersão dos resultados médios de contaminação, nas diferentes situações (a partir de dados da Tabela 8).

Na Tabela 9 encontram-se os coeficientes de correlação entre os distintos tipos de partículas, calculados com as médias da Tabela 7.

Tabela 9 – Correlações entre o número médio de partículas viáveis e não viáveis (média entre pontos e dias)

Correlação	N	r	r ²	p	Conclusão
Não viáveis 5 µm x Não viáveis 0,5 µm	20	0.6908	47.7%	0.0007	**
Viáveis x Não viáveis 0,5 µm	10	0.5103	26.0%	0.1318	NS
Viáveis x Não viáveis 5 µm	10	0.9224	85.1%	0.0001	**
Rodac x Não viáveis 0,5 µm	13	0.3569	12.7%	0.2312	NS
Rodac x Não viáveis 5 µm	13	0.7417	55.0%	0.0037	**
Rodac x Viáveis	12	0.8193	67.1%	0.0011	**

** Hipótese significativa ao 1%

NS Hipótese não significativa

r Fator de correlação

p Probabilidade

5.3 - Análise Estatística dos dados da “Rotina 2”

A partir de dados das salas 253, 256, 260, 270A, 270B, 270C e 270D e de diversos pontos destas salas foi realizado um acompanhamento das partículas não viáveis 0,5 μm , não viáveis 5 μm , viáveis e Rodac® durante um período de 1 mês. Neste período foram inspecionadas classes A1, A2 e A3.

Na Tabela 10 encontram-se medidas resumo do número de partículas não viáveis 0,5 μm , não viáveis 5 μm , viáveis e Rodac®.

Tabela 10 – Medidas resumo do número de partículas não viáveis de 0,5 μm e 5,0 μm , viáveis e Rodac®

Classe	Variável	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
A1	Não viáveis 0,5 μm	75	0.12	0.54	0	4
	Não viáveis 5 μm	75	0.00	0.00	0	0
	Viáveis	75	0.00	0.00	0	0
	Rodac	75	0.01	0.12	0	1
A2	Não viáveis 0.5 μm	375	572.19	1458.43	0	14772
	Não viáveis 5 μm	375	1.20	2.18	0	17
	Viáveis	375	0.38	2.43	0	40
	Rodac	375	0.13	1.09	0	17
A3	Não viáveis 0.5 μm	75	889.84	1446.55	0	6018
	Não viáveis 5 μm	75	4.81	19.14	0	164
	Viáveis	75	0.83	2.87	0	14
	Rodac	75	6.45	28.36	0	200

N = número de amostragens

DP = Desvio Padrão

Para avaliar as correlações entre as variáveis em estudo, trabalhou-se com o logaritmo (base 10) do número de partículas. Como não é possível calcular o logaritmo de zero, os zeros foram substituídos por 0,1. Note-se que esta substituição não invalida as análises já que, em geral, os valores medidos foram muito maiores que os valores substituídos. As correlações foram estimadas dentro das classes A1, A2 e A3. Os valores obtidos estão na Tabela 11.

Observa-se que o tamanho das correlações aumenta com o aumento da classe: quando o número de microrganismos é pequeno, as correlações são muito baixas ou desprezíveis (Figura 7).

Tabela 11 – Correlações entre as variáveis em estudo dentro das classes A1, A2 e A3

Classe	Correlação	N	R	r^2	p	Conclusão
A1	Não viáveis 5µm x Não viáveis 0,5µm	75	0.0000	0.0%	1.0000	NS
	Viáveis x Não viáveis 0.5 µm	75	0.0000	0.0%	1.0000	NS
	Viáveis x Não viáveis 5 µm	75	0.0000	0.0%	1.0000	NS
	Rodac x Não viáveis 0.5 µm	75	-0.0304	0.1%	0.7957	NS
	Rodac x Não viáveis 5 µm	75	0.0000	0.0%	1.0000	NS
	Rodac x Viáveis	75	0.0000	0.0%	1.0000	NS
A2	Não viáveis 5 µm x não viáveis 0.5 µm	375	0.4985	24.9%	0.0000	**
	Viáveis x Não viáveis 0.5 µm	375	0.1570	2.5%	0.0023	**
	Viáveis x Não viáveis 5 µm	375	0.0624	0.4%	0.2282	NS
	Rodac x Não viáveis 0.5 µm	375	0.0427	0.2%	0.4092	NS
	Rodac x Não viáveis 5 µm	375	0.0916	0.8%	0.0764	NS
	Rodac x Viáveis	375	0.1153	1.3%	0.0256	*
A3	Não viáveis 5 µm x Não viáveis 0.5 µm	75	0.6367	40.5%	0.0000	**
	Viáveis x Não viáveis 0.5 µm	75	0.2178	4.7%	0.0606	*
	Viáveis x Não viáveis 5 µm	75	0.0699	0.5%	0.5510	NS
	Rodac x Não viáveis 0.5 µm	75	0.2651	7.0%	0.0215	*
	Rodac x Não viáveis 5 µm	75	0.2056	4.2%	0.0767	NS
	Rodac x Viáveis	75	-0.1051	1.1%	0.3696	NS

* Hipótese significativa ao 5%
 ** Hipótese significativa ao 1%
 NS Hipótese não significativa
 n número de amostragens
 r fator de correlação
 p probabilidade

Em uma área limpa a carga microbiana é usualmente muito baixa, o que dificulta a obtenção de resultados estatisticamente significantes ⁴⁷.

Figura 7 – Correlações entre parâmetros de avaliação para as classes A1, A2 e A3.

Na interpretação do exposto, é interessante observar que foi possível detectar correlação entre partículas não viáveis e viáveis, o que se contrapõe a resultados obtidos por AKERS⁴. Ainda assim, é válido que se considere as razões apontadas pelo autor, que certamente contribuíram para que também no presente trabalho as correlações fossem limitadas, e nem sempre as mais perfeitas:

Algumas das razões descritas abaixo podem justificar a não obtenção de correlação entre as contagens⁴:

a) Todas as entradas de ar de uma sala limpa classificada se dão por meio de filtros HEPA. Os filtros HEPA operam no mesmo nível tanto em salas limpas classe 10.000 ou salas limpas classe 100. As diferenças são o número de trocas de ar por hora e também o movimento do ar dentro da sala. Aspecto a salientar é que as salas limpas são supridas com o ar filtrado pelos filtros HEPA, que possuem a mesma eficiência, tanto nas salas limpas classe 100 como nas salas limpas classe 10.000. Considerando que não ocorre a entrada de ar por nenhum outro meio, não há razão justificando

que salas limpas classe 100 tenham um menor número de partículas viáveis que as salas limpas classe 10.000.

b) O fator que controla o número de partículas viáveis, ou seja, o controle da contaminação nestas salas, baseia-se na habilidade dos operadores em trabalharem sem promover contaminação, graças ao domínio da técnica asséptica no desempenho das tarefas designadas.

c) É impossível que um engenheiro de salas limpas desenhe e construa uma sala limpa considerando os fatores ambientais e pessoas, pois estes fogem de seu controle. O *lay out* da sala e a qualificação das pessoas que irão trabalhar nesta sala ficam fora de seu controle, portanto, as salas limpas podem conter baixo nível de partículas não viáveis, mas não obrigatoriamente baixo número de partículas viáveis. A utilização de recursos como os filtros HEPA garantem reduzido número de partículas de tamanho 0.22 micra ou maior, mas não garantem baixas contagens de microorganismos. O ideal seria a ausência do operador no processo, evitando assim possível contaminação.

d) Salas limpas com manutenção adequada, geralmente não apresentam altos níveis de contaminação microbiana. Isto se deve a fatores como programa de sanitização das salas limpas, alinhado com a técnica asséptica dos operadores, e também ao fato de que os microorganismos precisam de fontes de carbono e fonte de energia para se multiplicarem, sendo portanto rara a colonização nos dutos de ar.

Considerando o Federal Standard 209 E e a United States Pharmacopeia, é incorreto pensar que existe um paralelo preciso entre as contagens de partículas não viáveis e partículas viáveis. No entanto é correto dizer que a “limpeza microbiológica” será melhor numa sala limpa onde o número de partículas não viáveis apresenta menor número, de acordo com sua classificação. Existem diversos fatores que afetam o nível de partículas viáveis nas salas limpas, entre eles o pessoal. Portanto as salas limpas podem ser classificadas apenas utilizando as contagens de partículas não viáveis⁴.

5.4 - Estudo dos microrganismos presentes por classe de sala limpa

Conforme WHYTE E COLABORADORES ⁷¹, a preocupação de níveis mínimos de contaminação envolve particularmente parenterais de grande volume, nos quais não se admite o emprego de sistemas conservante. Já no caso de parenterais de pequeno volume, maior cuidado deve residir em que sua concentração seja a mínima para reduzir efeitos tóxicos, mas suficiente para impedir a proliferação microbiana. Estes autores ressaltam a importância de empregar, neste desafio, *Pseudomonas cepacia* e *Enterococcus agglomerans* como representantes dos Gram negativos, e *Staphylococcus aureus* como representante dos Gram positivos. Este aspecto, entre outros, denota a importância do conhecimento qualitativo do *Bioburden* ambiental. Assim, no presente trabalho foram detectados contaminantes do gênero *Staphylococcus* e *Pseudomonas*, embora o último não se localize entre os mais frequentemente isolados.

Ao se avaliar as bactérias obtidas nas amostragens efetuadas no presente trabalho, deve-se considerar que 49 (11,8%) foram bactérias Gram negativas, geralmente todas como mais susceptíveis a desidratação ⁷⁰.

Para avaliar o tipo de microrganismo presente nas salas estudadas foram construídas as Tabelas 12 (sem discriminar por classe de sala) e 13 (com discriminação da classe). As determinações das Tabelas 12 e 13 foram realizadas em 103 pontos classe A2, 7 pontos classe A3 e 103 pontos classe A4.

As porcentagens da Tabela 12 foram calculadas em função do total de pontos em que foi observado algum microrganismo, enquanto que as porcentagens da Tabela 13 foram calculadas em função do total de pontos inspecionados para cada classe. As porcentagens das Tabelas 12 e 13 foram representadas nas Figuras 8 e 9.

Os microrganismos mais comuns foram: *Bacillus sp*, *Staphylococcus sp*, *Corynebacterium sp* e *Staphylococcus haemolyticus*. No total estes quatro microrganismos estiveram presentes em aproximadamente 80% das determinações.

Pela Tabela 13 e Figura 9 observa-se que todos os microrganismos encontram-se aproximadamente na mesma proporção em todas as classes (A2, A3 e A4).

Tabela 12 – Microrganismos presentes nos pontos estudados por ordem de importância

Microrganismo	Tipo	n	%
<i>Bacillus sp</i>	Bacilo G+	119	28.67%
<i>Staphylococcus sp</i>	Coco G+	93	22.41%
<i>Corynebacterium sp</i>	Bacilo G+	70	16.87%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Coco G+	46	11.08%
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Coco G+	15	3.61%
<i>Alcaligenes xilosoxidans</i>	Bacilo G-	14	3.37%
<i>Flavobacterium sp</i>	Bacilo G-	11	2.65%
<i>Flavobacterium breve</i>	Bacilo G-	9	2.17%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Coco G+	7	1.69%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Bacilo G-	6	1.45%
<i>Pseudomonas sp</i>	Bacilo G-	5	1.20%
<i>Staphylococcus auricularis</i>	Coco G+	5	1.20%
<i>Micrococcus luteus</i>	Coco G+	4	0.96%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco G+	4	0.96%
<i>Comamonas acidovorans</i>	Bacilo G-	3	0.72%
<i>Staphylococcus cohnii</i>	Coco G+	3	0.72%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Bacilo G-	1	0.24%
Total		415	100%

G = Gram

n = número de identificações

Tabela 13 – Microrganismos presentes nos pontos estudados por classe e por ordem de importância

Microrganismo	A2	A3	A4
<i>Bacillus sp</i>	60%	43%	52%
<i>Staphylococcus sp</i>	35%	43%	52%
<i>Corynebacterium sp</i>	31%	71%	32%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	21%	29%	21%
<i>Staphylococcus xylosus</i>	4%	0%	11%
<i>Alcaligenes xiloxidans</i>	1%	0%	13%
<i>Flavobacterium sp</i>	8%	0%	3%
<i>Flavobacterium breve</i>	5%	0%	4%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1%	0%	6%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1%	14%	4%
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1%	0%	4%
<i>Pseudomonas sp</i>	4%	0%	1%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4%	0%	0%
<i>Micrococcus luteus</i>	0%	14%	3%
<i>Staphylococcus cohnii</i>	0%	0%	3%
<i>Comamonas acidovorans</i>	0%	14%	2%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1%	0%	0%

Figura 8 – Microrganismos encontrados em salas classe A2, A3 e A4

Figura 9 – Microrganismos encontrados por classe A2, A3 e A4

6 – CONCLUSÃO

1 – Existe predominância positiva de correlação, próxima de 0,6, entre os diferentes locais de amostragem, tanto para partículas não viáveis de 0,5 como 5,0 μm (Figura 2).

2 – Inexiste correlação entre partículas não viáveis de 0,5 e 5,0 μm em locais providos de fluxo laminar (C8, Figura 2).

3 – As correlações entre locais com o número de partículas viáveis de ambiente ou superfície (Rodac®) são pobres (entre -0,4 e +0,4) e inferiores às não viáveis.

4 – A situação após sanitização provocou redução intensa no número de partículas viáveis de superfícies (Rodac®) (Tabela 8).

5 – Existe correlação entre partículas viáveis e não viáveis de 5,0 μm , no ambiente (Figura 5).

6 – A situação dinâmica não provocou elevação uniforme no número de partículas viáveis de superfícies (Rodac®) (Tabela 8).

7 – A situação dinâmica apresentou correlação entre partículas viáveis do ambiente e o nível decrescente de limpeza da sala (A1-A4) (Tabela 8, Figura 6).

8 – Os valores de correlação obtidos entre partículas não viáveis de 0,5 e 5,0 μm e viáveis aumenta proporcionalmente com o nível de sujidade da área (A1-A4) (Tabela 10).

9 – Em relação a identificação microbiana, os microorganismos mais frequentes foram *Bacillus sp*, *Staphylococcus sp* e *Corynebacterium sp* (Tabela 12).

10 – Houve constância na prevalência de cepas microbianas identificadas nas diferentes classes de ambientes (A2,A3 e A4) (Tabela 13, Figura9)

7 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. AGALLOCO, J. Barriers, isolators and microbial control, *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.53, n.1, p.48-53, 1999.
2. AGALLOCO, J. Qualification and validation of environmental systems. *J. Parenter Sci. Technol.*, Philadelphia, v.50, n.5, p.280-289, 1996.
3. AGALLOCO, J. Steam sterilization-in-place technology. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.44, n.5, p.253-256, 1990.
4. AKERS, J. E. Environmental monitoring and control proposed standards, current practices, and future directions. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.51, n.1, p.36-47, 1997.
5. ASEPTIC processing and terminal sterilization. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.45, n.6, p.254-258, 1991.
6. ATHAYDE, A. Vestimenta adequada contribui para redução da contaminação. *Rev. Soc. Bras. Control. Contam.*, São Paulo, n.10, p.12-14, 1999.
7. ATHAYDE, A. Higienização de áreas limpas deve respeitar padrões de classificação. *Rev. Soc. Bras. Control. Contam.*, São Paulo, n.9, p.24-27, 1999.
8. AUSTIN, P. R. How to design the practical cleanroom. *Med. Device Diag. Ind.*, Santa Monica, v.12 n.2, p.42-47, 1990.
9. AVALLONE, H. Current regulatory issues regarding parenteral inspections. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.43, n.1, p.3-7, 1989.

10. AVALLONE, H.L. Control aseptic of aseptically produced products. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.39, n.2, p.75-79, 1995.
11. AYDLETT, J. GORDON, B., MAY, J. Rapid/automated id methods survey. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.44, n.4, p.216-222, 1990.
12. BARR, D. B. FDA's aseptic processing: proposed regulation. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.47, n. 2, p.57-59, 1993.
13. BEAUPIN, C.M., LIEBSCHUTZ, S., BENSADOUN, J. Bacteriologic survey a cleanroom. *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, Bethesda, v.52, p.2469-2470, 1995.
14. BEDSON, P, SARGENT, M. The development and application of guidance on equipment qualification of analytical instruments. *Accred. Qual. Assur*, Berlim, v.1, p.265-274, 1996.
15. BEER, C.L. Gowning training: use of video recording together with microbial assessment. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.45, n.3, p.128-131, 1995.
16. BENNETT, E., Roteiro para certificação de salas limpas, In: SEMINÁRIO: NOVOS RUMOS NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA, São Paulo: UNIFAR, 1997. 20p. (Curso).
17. BLACKMER, R.A. Sterile operations facility. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.38, n.5, p.183-189, 1984.
18. BUOGO, A., GUERRATO, G., GUILIONE, A., PAPAKRISTO, G. Aspectti microbiologic dell'ambient farmaceutico. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, n.1, p.8-17, 1979.
19. CHANDLER, S.W., TRISSE, L.A., WAMSLEY, L.M., LAJEUNESSE, J.D., ANDERSON, R.W. Evaluation of air quality in a sterile drug preparation area with an eletronic particle counter. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v.50, p.2330-2334, 1993.
20. CHASEY, A. D. Advanced technology facility construction education. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14,

PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.359-363, 1998.

21. CROLL, D. The evolution of isolation technology in a developing biotechnology company. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.329-331, 1998.

22. CUNDEL, A.M., BEAN, R., MASSIMORE, L., MAIER, C. Statistical analysis of environmental monitoring data: does a worst case time for monitoring clean room exist? *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.52, n.6, p.326-330, 1998.

23. CYTRYNBAUM, H. M. Pessoal: o principal fator em operações de salas limpas. *Rev. Soc. Bras. Control. Contam.*, São Paulo, n.10, p.19-24, 1999.

24. DENNY, V. F., MARSIK, F. J. Current practices in the use of disinfectants within the pharmaceutical industry. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.51, n.6, p.227-228, 1997.

25. DIXON, A.M. Training cleanroom personnel. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.45, p.276-278, 1991.

26. DRAFT guidelines on quality assurance of pharmacy-prepared sterile products, *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v.49, p.407-417, 1992.

27. EZELL, J.R., GODWIN, H.N., HASSENEIN, R.N., MATCHETT, J.A. Control of videocassette and personal instruction methods for training pharmacy personnel in aseptic technique. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v.45, n.10, p.2112-2116, 1998.

28. INSTITUTE of Environmental Sciences. Federal standard 209 E: airborne particulate cleanliness in cleanrooms and clean zones, Mount Prospect: IES, 1992. 48p.

29. FOARDE, K. K., DIXON, A. M. New methods of microbial and surface contamination removal. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.588-594, 1998.

30. FRIEBEN, W.R. Control of the aseptic processing environment. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v.40, p.1928-1935, 1983.
31. FUJISHITA, O., TOSHIKI, S., AYAKI, H., KENJI, O., TOSHINOBU, A., OISHI, R. The evaluation of sizing accuracy of particle counters for parenteral drugs. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.49, n. 6, p.267-270, 1995.
32. FUNDAMENTALS of a microbiological environmental monitoring program, *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, vol.44, supl.1990, 16p.
33. GRIMME, R., KOLBLIN, R., SCHULE, A., TRICK, I. Detection of biological contamination. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.575-580, 1998.
34. FOOD and Drug Administration. Guideline on sterile drug products produced by aseptic processing , Rockville, FDA 1987, 43p.
35. HANSZ, T. E., LINAMEN, D. R. Planning, programming, designing, and constructing a cleanroom. *Med. Device Diag. Ind.*, Santa Monica, v.17, n.2, p.73-86, 1995.
36. HENKE, C. How "clean" should medical device cleanrooms be? *Med. Device Diag. Ind.*, Santa Monica, v.14, n.2, p.40-75, 1992.
37. HERTROYS R., VAN VUGHT, P.A.M., VAN DE DONK, H.J.M. Moving towards a (microbiological) environmental monitoring program that can be used to release aseptically produced pharmaceuticals: a hypotheses, a practical program, and some results. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.51, n.1, p.52-59, 1997.
38. HUISKAMP, H. Contamination control in relation with medical device ce qualification. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.115-121. 1998.
39. INSTITUTE of Environmental Sciences and Technology, IEST-RPCC-0062: testing clean rooms, Mount Prospect: IES, 1992. 35p.

40. JONES, R. Áreas limpas: conceito, limpeza, manutenção e certificação. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.3, supl.1, p.27-32, 1997.
41. JORNITZ, M.W, SARTORIUS, A. G. Proposal for isolator vetting with sterilizing grade membrane filter cartridges. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.489-494, 1998.
42. KRAFT, R. Cleanroom-construction concerns. *Am J. Healthy-Syst. Pharm.*, Bathesda, v.51, p.935, 1994.
43. KRAINIAK, R. Latest in isolation, containment and barrier technology. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.215-219, 1998.
44. LIBERMAN, A. C.; SHEPHERD, C. Particle measurement procedures for cleanroom monitoring and assuring compliance with ISO 14644-1 or with federal standard 209E. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.548-555, 1998.
45. LJUNGQVIST, B. REINMULLER, B. The biotest rcs air samplers in unidirectional flow. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.48, p.41-44, 1994.
46. LJUNGQVIST, B. REINMULLER, B. HACCP and limitation of risk in clean zones. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.400-404, 1995.
47. LJUNGQVIST, B. REINMULLER, B. Interaction between air movements and the dispersion of contaminants: clean zones with unidirectional air flow. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.47, p.60-69, 1993.
48. LUMINI, E. Flusso d'aria laminare: applicazione ai locali sterili. *Boll. Chim. Farm.*, Milan, n.7, p.361-375, 1975.

49. MACKLER, S. E. Modular facilities delivery. *Environ. Sci. Technol.*, Washington, p.332-339, 1998.
50. MATTHEWS, R. A. Cleanroom globalization is here, hello ISO, are you ready? In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.102-109, 1998.
51. MATTHEWS, R. A. Cleanroom basics: a guide for the perplexed. *Med. Device Diag. Ind.*, Santa Monica, v.16, n.2, p.57-62, 1994.
52. PDA comments on usp in-process revision 1116, microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments, clean zones with unidirectional air flow. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.49, p.264-266, 1995.
53. PDA comments: usp on microbiological evaluation of clean rooms and other controlled environments <1116>. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.51, p.222-226, 1997.
54. PDA presentation at FDA open conference on sterile drug manufacturing. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.48, n. 8, p.4-6, 1994.
55. PELLIZZI, R. J. Developing a successful cleanroom cleaning and maintenance program. *Med. Device Diag. Ind.*, Santa Monica, v.14, n.2, p.50-53, 1992.
56. PELLIZZI, R. J. Federal standard 209 E: plan for change. *Med. Device Diag. Ind.*, Santa Monica, v.15, n.2, p. 40-42, 77-78, 1993.
57. PENG, F., TU, G. Optimal study of local unidirectional flow cleanroom. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.227-232, 1998.
58. ROBERTSON, L. D. Monitoring viable fungal and bacterial bioaerosol concentrations to identify acceptable levels for common indoor environments. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14,

PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.73-79, 1998.

59. SANTOS, D. Fabricação de lentes fotocromáticas utiliza salas limpas. *Rev. Soc. Bras. Control. Contam.*, São Paulo, n.10, p.25-28, 1999.

60. SCHICHT, H. H. International cleanroom standards and their impact on the pharmaceutical industry. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.110-144, 1998.

61. SHARP, J. Aseptic validation of a form/fill/seal installation: principles and practice. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.44, p.289-292, 1990.

62. SEYMOUR, M., BABAN, F., MACGIBBON, B. Adopting new standards for cleanroom design. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.259-262, 1998.

63. SRICH, E. User requirements and design specifications of isolator containment for pharmaceutical production. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CONTAMINATION CONTROL, 14, PHOENIX, 1998. Proceedings, Phoenix: Institute of Environmental Sciences and Technology, p.340-349, 1998.

64. STAINES, L. Design control and validation of a facility for sterile clinical trial preparations. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.38, n.3, p.109-114, 1984.

65. THIBEAULTI, A. How to design a validation program for cleanrooms. *Med. Device Diag. Ind.*, Santa Monica, v.17, n.5, p. 216-223, 1995.

66. VALIDATION and environmental monitoring of aseptic processing. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.44, p.272-277, 1990.

67. VERMEIJ, P., KRAUS, J.J.A.M. Sudden breakdown of a HEPA filter. *Am. J. Hosp. Pharm.*, Washington, v.43, n.1, p.59, 1986.

68. WHYTE, W. Sterility assurance and models for assessing airborne bacterial contamination. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.40, n.5, p.188-197, 1996.
69. WHYTE, W. The influence of clean room design on product contamination. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.38, n.3, p.102-108. 1984.
70. WHYTE, W., NIVEN, L. Airborne bacteria sampling: the effect of dehydration and sampling time. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.40, n.5, p.182-187, 1986.
71. WHYTE, W., NIVEN, L., BELL, N.D. Microbial growth in small volume pharmaceuticals. *J. Parenter. Sci. Technol.*, Philadelphia, v.43, n.5, p.208-212, 1989.
72. WRIGHT, B. Detailed planning to upgrade the sterile-products preparation area to a cleanroom. *Am. J. Healthy-Syst. Pharm.*, Bethesda, v.52, p.1750, 1753, 1755, 1995.

8 - SUMÁRIO

Este trabalho consiste em um estudo sobre monitoramento ambiental de áreas limpas. Os parâmetros comparados foram partículas não viáveis de 0,5 e 5,0 μm , contaminação do ambiente (UFC do ar) e de superfícies (Rodac®). Procedeu-se ao estudo em áreas de manipulação crítica (Classe A). Nestas áreas, a amostragem foi feita em situações de repouso e dinâmica, antes e após sanitização, e em etapas de certificação e rotina. Os dados de literatura indicam que os parâmetros não são particularmente dependentes do *lay out* ou classificação das áreas, mas sim do seu uso e do comportamento dos operadores. As conclusões foram positivas quanto a correlação entre diferentes locais de amostragem, para partículas não viáveis de 0,5 e 5,0 μm , e ausência deste tipo de correlação em posições em fluxo laminar. Também, os valores de correlação foram quase sempre decrescentes com a maior limpeza do ambiente. Os microrganismos mais frequentemente isolados, nas áreas A2, A3 e A4 foram *Bacillus sp*, *Staphylococcus sp* e *Corynebacterium sp*.

9 – SUMMARY

This paper represents a study about environmental monitoring data for cleanrooms. The parameters that were compared are: total airborne particles of 0,5 and 5.0 μm , airborne colony forming units (CFU's) and CFU's on surfaces (Rodac®). Most attention was paid to areas where critical handling is performed (class A areas). In these areas sampling was performed "at rest" and "dynamic" conditions, before and after sanitization and during certification and routine steps. These data indicates that the parameters are not particularly dependent upon the lay out or classification of areas, but rather on the use of the areas, and how the operators behave in them. Evaluating the data, the conclusion was about a correlation among different sampling places, for total airborne particles of 0,5 and 5.0 μm , and absence of this kind of correlation in laminar flows positions. Also, correlation values were always increasing with the cleanliness of the environment. The microorganisms most frequently isolated in areas A2, A3 and A4 were *Bacillus sp*, *Staphylococcus sp* and *Corynebacterium sp*.