UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação de indicadores biológicos na validação de processos de esterilização de isoladores por peróxido de hidrogênio

Lilian Cristina Menegon de Castro

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Profa. Tit. Terezinha de Jesus A. Pinto

São Paulo
2004

Lilian Cristina Menegon de Castro

Avaliação de indicadores biológicos na validação de processos de esterilização de isoladores por peróxido de hidrogênio

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
(Orientadora/Presidente)

Profa. Dra. Nadia Araci Bou Chacra
1ª. Examinadora

Profa. Dra. Kazuko Uchikawa Graziano
2ª. Examinadora

São Paulo, 28 de setembro de 2004.

Agradecimentos

À minha família, em especial aos meus pais Adão e Valentina, pelo amor, confiança, apoio e pelos ensinamentos sobre a vida.

À Profa Dra Terezinha, minha orientadora, pelos conhecimentos transmitidos durante estes anos, por sua confiança, apoio, estímulo e respeito por minhas limitações.

A Antônio Eduardo Ripari Neger pelo estímulo e carinho.

À Catherine Simões de Abreu e Débora Cristina Oliveira, amigas que sempre estiveram presentes.

A Cláudio Sombini pelo incentivo,apoio e concessão de dados.

Às secretárias da Pós Graduação pela orientação.

Às professoras Mitsuko e Satiko pela correção e avaliação do trabalho na fase de qualificação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 13
2.1. Histórico e aplicação da tecnologia dos Isoladores 15
2.2. Vantagens da utilização dos isoladores 22
2.2. Vantagens da utilização dos isoladores 22
2.3. Processos esterilizantes 25
2.4. Mecanismo de morte dos esporos de Bacillus quando do tratamento por peróxido de hidrogênio[28] 29
2.5. Processo esterilizante pela utilização de peróxido de hidrogênio[44] 32
2.6. Particularidades da utilização do processo de esterilização por peróxido de hidrogênio em isoladores 36
3. OBJETIVO 37
4. MATERIAL E MÉTODO 38
4.1 Material 38
4.2 Método 39
4.2.1 Determinação dos microrganismos representativos da microbiota da área produtiva 39
4.2.1.1 Amostragem passiva de ar para partículas viáveis 42
4.2.1.2 Amostragem ativa de ar para partículas viáveis 42
4.2.1.3 Amostragem de superfície para partículas viáveis 42
4.2.3 Determinação do carreador/suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico 43
4.2.3.1 Procedimento 43
4.2.4 Determinação do microrganismo mais resistente a ser utilizado como indicador biológico 49
4.2.4 .1 Procedimento 50
5. RESULTADO E DISCUSSÃO 56
6. CONCLUSÃO 81
REFERÊNCIAS 82
ANEXOS 88
RESUMO 105
ABSTRACT 106

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplo de isolador utilizado para a condução de teste de esterilidade. Marca Microflow..... 20

Figura 2 – Exemplo de isolador utilizado para a manufatura de produtos estéreis. Marca Carlisle..... 21

Figura 3 – Exemplo do equipamento utilizado para a conversão do peróxido de hidrogênio da forma líquida para gás. Marca Steris, modelo VHP 1000..... 35

Figura 4 - Microrganismos encontrados em salas classe 100, 10.000 e 100.000 59

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos diversos tipos de materiais comumente encontrados no interior dos isoladores e seu emprego. 44

Tabela 2 - Parâmetros do ciclo de VHP utilizado no teste de compatibilidade dos materiais encontrados no interior dos isoladores frente a exposição ao peróxido de hidrogênio a 35%..... 47

Tabela 3 – Condições de incubação dos microrganismos veiculados em suporte de aço inoxidável..... 54

Tabela 4 - Microrganismos presentes nos pontos estudados por ordem de importância..... 58

Tabela 5 - Concentração de VHP medida durante o ciclo de esterilização para a determinação do suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico com a utilização de peróxido de hidrogênio a 35% e *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^6 UFC/0,01ml (corrida 1)..... 60

Tabela 6 - Concentração de VHP medida durante o ciclo de esterilização para a determinação do suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico com a utilização de peróxido de hidrogênio a 35% e *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^2 UFC/0,01ml (corrida 2)..... 61

Tabela 7 - Concentração de VHP medida durante o ciclo de esterilização para a determinação do suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico com a utilização de peróxido de hidrogênio a 35% e *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^2 UFC/0,01ml (corrida 3)..... 62

Tabela 8: Concentração da suspensão de *Bacillus stearothermophilus* utilizado na determinação do suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico com utilização de peróxido de hidrogênio na concentração nominal de 35% na forma líquida..... 63

Tabela 9 – Letalidade do *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^6 UFC/0,01mL veiculados em suportes de diversas naturezas presentes no interior de isoladores após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio na concentração nominal de 35% na forma líquida. (Corrida 1)..... 69

Tabela 10 - Letalidade do *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^2 UFC/0,01mL veiculados em suportes de diversas naturezas presentes no

interior de isoladores após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio na concentração nominal de 35% na forma líquida. (Corrida 2) 71

Tabela 11 - Letalidade do *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^2 UFC/0,01mL veiculado em suporte de silicone após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio na concentração nominal de 35% na forma líquida. (Corrida 3) 73

Tabela 12 – Compilação do Valor D dos diversos materiais presentes no interior dos isoladores inoculados com *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^6 UFC/0,01mL (Corridas 1) e 10^2 UFC/0,01mL (Corridas 2 e 3)..... 74

Tabela 13: Concentração de VHP observada durante a execução do teste de etalidade do *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^6 UFC/0,01mL veiculados em suportes de diversas naturezas presentes no interior de isoladores após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio a 35% (Corrida 4) 76

Tabela 14 - Letalidade dos diversos microrganismos presentes na microbiota da área produtiva e *Bacillus stearothermophilus* veiculados em suportes de aço inoxidável após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio a 35% (Corrida 4) 79

Tabela 15 – Comparação Valor D microbiota e *Bacillus stearothermophilus* 80

Tabela 16 - Interpretação do cartão NHI do Vitek® 95

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: Ácido Dipicolínico

DNA: Ácido Desoxi Ribonucléico

HEPA: High efficiency particulate air ou ar com alta eficiência de partículas

MHRA: Medicinal and Health Regulatory Agency

NPP: nutrição parenteral periférica

PIC: Pharmaceutical Industries Commitee

SAL: Sterility assurance level ou nível de segurança de esterilidade

Start-up: preparação de um equipamento ou sala para o início das atividades

UFC: Unidade formadora de colônia

VHP: Vapor hydrogen peroxide ou vapor de peróxido de hidrogênio

LISTAS DE SÍMBOLOS

°C: Graus Celsius

g: Grama

L: Litro

mg: Miligramas

Min: Minuto

mL: Mililitro

1. INTRODUÇÃO

Devido a forte correlação existente entre a intervenção humana nos processos de manufatura e seu potencial poder de contaminação de medicamentos estéreis ou processos assépticos, alternativas para a remoção dos operadores das zonas críticas, nas quais há a manipulação direta do produto, vêm sido desenvolvidas e implementadas. As áreas limpas, com classes de pureza definidas e que revolucionaram a indústria farmacêutica há cerca de 20 anos, estão sendo substituídas por barreiras ou isolamentos. Esta nova possibilidade tem como mérito minimizar a influência do ser humano, e ser passível de esterilização[3,16,34,43]. A automatização de processos também têm sido um recurso muito utilizado para a redução ou eliminação da influência do operador nos processos assépticos[43].

Tratando-se de tecnologia inovadora, os isoladores merecem estudos particularizados quanto à definição da variedade microbiana de escolha para os desafios, assim como aspectos de inoculação, escolha de suporte e condições de recuperação ideais. Os agentes esterilizantes disponíveis são variados, sendo o peróxido de hidrogênio o de destaque para a esterilização de isoladores, por apresentar baixa toxicidade e por propiciar fácil eliminação do ambiente no qual foi aplicado[27].

O processo de esterilização por peróxido de hidrogênio apresenta algumas variáveis a serem controladas, necessitando a comprovação de sua eficácia através da

utilização de indicadores biológicos como ferramenta de controle, permitindo a avaliação da influência dos diversos parâmetros sobre o poder microbicida do agente esterilizante, comprovando a eficácia do ciclo de esterilização no que tange a capacidade letal dos microrganismos neles contidos.

Monitores biológicos comerciais veiculados em suporte de aço inoxidável com inóculos pré-determinados de *Bacillus stearothermophilus,* são comumente utilizados para se desafiar e comprovar a capacidade letal do agente esterilizante[44]. Entretanto, pode-se observar uma tendência e expectativa por parte das agências reguladoras na exigência da comparação da letalidade de monitores biológicos comerciais e microrganismos da microbiota da área produtiva frente a exposição ao agente esterilizante. Este fato se deve a uma probabilidade remota dos monitores biológicos preparados por instituições terceirizadas, possuírem resistência microbiológica diferenciada, podendo ser inferior àquela característica da microbiota normal. Vale ressaltar que a adoção da nomenclatura monitor é válida, como tratada por HASTRUP[20],quando se emprega o termo indicador, uma vez que os esporos são praticamente um sensor, pois são submetidos a desafios equivalentes ao produto ou material, sendo portanto um monitor.

Desde modo, a capacidade letal do agente esterilizante frente aos microrganismos presentes na área produtiva onde os isoladores estão instalados, deve ser desafiada. Adicionalmente a utilização de suportes de diversos materiais

normalmente existentes no interior de isoladores também deve ser considerada de modo a simular as condições reais de aplicação do peróxido de hidrogênio como agente esterilizante e justificar deste modo a utilização do aço inoxidável como suporte padrão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A manufatura de medicamentos estéreis abrange uma série de requisitos em relação ao controle do ambiente de produção, tais como aplicação de agentes sanitizantes ou esterilizantes, monitoramento da qualidade do ar, com a finalidade da obtenção de um produto seguro[35]. Para se garantir o cumprimento de tais exigências a existência de salas limpas é fundamental, na qual a checagem periódica da qualidade microbiológica do ambiente e operadores é constante. A execução de testes analíticos microbiológicos e físico-químicos nos produtos também fornecem dados adicionais que possibilitam a confirmação que o processo de fabricação foi realizado conforme as Boas Práticas de Fabricação vigentes e que atendem a finalidade para o qual são destinados.

Embora as técnicas de monitoramento ambiental de áreas produtivas forneçam dados valiosos sobre a qualidade microbiológica durante o processo de fabricação de um dado produto estéril, a interferência humana ainda é um fator impactante, sendo essencial que o operador esteja sempre em boas condições de saúde, que mantenha treinamento específico atualizado[4,7,8,9,18,23] e que esteja com paramentação adequada, sendo normalmente constituída por vestimentas de material sintético, que não libera partículas. Desde modo, durante o estabelecimento das condições de operação de salas limpas, deve-se considerar entre outros fatores, o estabelecimento de uma temperatura de conforto.

Com o advento dos critérios de validação nos últimos 20 anos, algumas tecnologias que visam à contenção e minimização da contaminação microbiana em áreas assépticas foram desenvolvidas e aplicadas. Dentre estas, pode-se destacar as barreiras e os isoladores, sendo estes conceitualmente diferentes. Barreira pode ser definida como um objeto material que separa, demarca ou serve como barreira. Já o isolador é um equipamento que fornece a completa separação entre um ambiente e outro[1,15,17,26,42,46].

2.1. Histórico e aplicação da tecnologia dos Isoladores

O primeiro protótipo de isolador data a Segunda Guerra Mundial, na qual Gloveboxes, ou caixas com luvas, visavam proteger o processo de uma possível intervenção do operador ou o operador de uma possível exposição ao processo[40]. Primeiramente, as gloveboxes foram desenvolvidas para a manipulação de armas atômicas, e tiveram seu uso continuado dentro da indústria de poder nuclear até os dias de hoje. Também foram aplicadas para outros propósitos, como por exemplo, para a contenção de microrganismos patogênicos, haja vista a utilização de Cabines de Segurança Biológica Classe III[9].

De acordo com COLES[9], há aproximadamente 15 anos, a população começou a exigir melhorias na qualidade dos produtos e ao mesmo tempo, maior segurança para os operadores quando da execução de processos nos quais havia a manipulação de substâncias potencialmente perigosas. Alinhada as novas exigências, a La Calhene, empresa francesa que criara o equipamento para ser utilizado na indústria nuclear, propôs a utilização deste mesmo na indústria farmacêutica. Este novo equipamento, diferentemente das gloveboxes, possuía um sistema de filtração de ar com filtros de alta eficiência de partículas (HEPA) que permitia uma maior segurança ao processo, por garantir o fornecimento de ar que atende aos critérios estabelecidos para Classe 100 (em relação a partículas viáveis e não viáveis), requisitada para a manipulação e manufatura de produtos farmacêuticos estéreis[9].

Os sistemas de barreiras mais utilizados são as antecâmaras, máscaras faciais, luvas, fluxo laminar, dentre outros que fornecem um grau de separação em relação ao operador e o ambiente de trabalho, porém não permite uma separação física real impossibilitando uma segregação absoluta entre o operador e a área estéril ou zona crítica de trabalho. Basicamente as barreiras são sistemas abertos que permitem a troca de ar e contaminantes com o ambiente adjacente, durante seu uso[1].Vale ressaltar que as barreiras exigem uma manipulação durante o set-up dos equipamentos e algumas intervenções durante o processo através de operadores devidamente paramentados na área assépticas/limpa. Uma das maiores desvantagens das barreiras é a impossibilidade da aplicação de processos de esterilização, devido a dificuldade de confinação do gás do agente esterilizante.

Os isoladores permitem a aplicação de gases de agentes esterilizantes, possibilitando a obtenção de um ambiente estéril por serem estanques, isto é, não há troca do ar presente no interior do equipamento com o do ambiente externo, durante seu funcionamento normal. Esta propriedade aliada a possibilidade da eliminação da interferência física humana do processo asséptico torna a utilização dos isoladores uma opção muito mais vantajosa quando comparada as operações de processos em salas limpas convencionais[1,2]. Adicionalmente, a necessidade de se possuir uma área classificada baseada na contagem de partículas não-viáveis e viáveis, pode ser significantemente reduzida o que torna a utilização dos isoladores, uma opção relevante[43]. Segundo o MHRA a área na qual o isolador está instalado deve atender

pelo menos aos critérios da Classe 100.000[26], embora o PIC recomenda a operação de isoladores em Classe 10.000. Esta possibilidade é de grande valia uma vez que as salas limpas convencionais exigem o atendimento aos critérios estabelecidos para a Classe 10.000[35] .

A aplicação dos isoladores é vasta, podendo-se destacar ainda sua utilização para a realização de testes de esterilidade, cuja maior vantagem é a taxa zero de incidência de resultado falso-positivo, tornando desnecessário a realização de retestes, permitindo a obtenção de resultados extremamente confiáveis [9,25]. Os isoladores utilizados para a condução de testes de esterilidade são geralmente constituídos por paredes flexíveis, cujo material mais comum é o PVC. Podem possuir uma vestimenta interna que possibilita o isolamento total do analista e o ambiente de teste (conhecido como Half Suit), ou ainda ser constituído de sistemas de luvas que permitem o acesso ao ambiente interno do equipamento. Normalmente operam com pressão positiva e propiciam a realização de testes de esterilidade pelo método da inoculação direta ou filtração[18,30,47].

Outra aplicação de destaque está associada ao emprego de isoladores em processos de manufatura de produtos estéreis[14,39], devido a possibilidade da obtenção de um ambiente estéril, com SAL que pode atingir 10^{-6} em compraração a utilização de salas limpas que permite somente a aplicação de agentes sanitizantes, no qual a obtenção deste nível de SAL é inviável[2].

Os isoladores também podem ser destinados a contenção de substâncias tóxicas evitando a exposição do operador a um possível contato com a substância ou molécula em questão, podendo sob vácuo que visa minimizar a probabilidade de uma contaminação ou espalhamento da substância tóxica, em caso de acidente[7,11,39]. Para tal finalidade, recomenda-se o emprego de isoladores com parede rígida.

A utilização de isoladores em farmácias hospitalares ainda é discreta, porém com uma vasta aplicabilidade. Pode-se citar como exemplo a preparação de NPP que geralmente é manipulada em áreas limpas convencionais sob fluxo laminar. A possibilidade de se utilizar um ambiente estéril para tal finalidade, se torna indubitavelmente, a melhor opção no que tange o SAL, principalmente considerando-se que os pacientes que receberão este tipo de nutrição estão hospitalizados e com a resistência a agentes microbiológicos deficitária. Outra aplicação hospitalar para os isoladores, é a proteção dos operadores quando da manipulação de agentes citotóxicos[2,9,12,24] ou durante a preparação de radiofármacos.

Dentre outros inúmeros empregos dos isoladores, pode-se citar o uso no isolamento biomédico, destinado a obtenção de animais empregados em pesquisas e cuja contaminação por microrganismos existentes no ambiente é indesejada Outra aplicabilidade, está associada ao uso dos isoladores em intervenções cirúrgicas,

principalmente em pacientes imunodeprimidos. Por fim, o uso de isoladores na indústria alimentícia e de semicondutores já é uma realidade[9].

Figura 1 – Exemplo de isolador utilizado para a condução de teste de esterilidade. Marca Microflow.

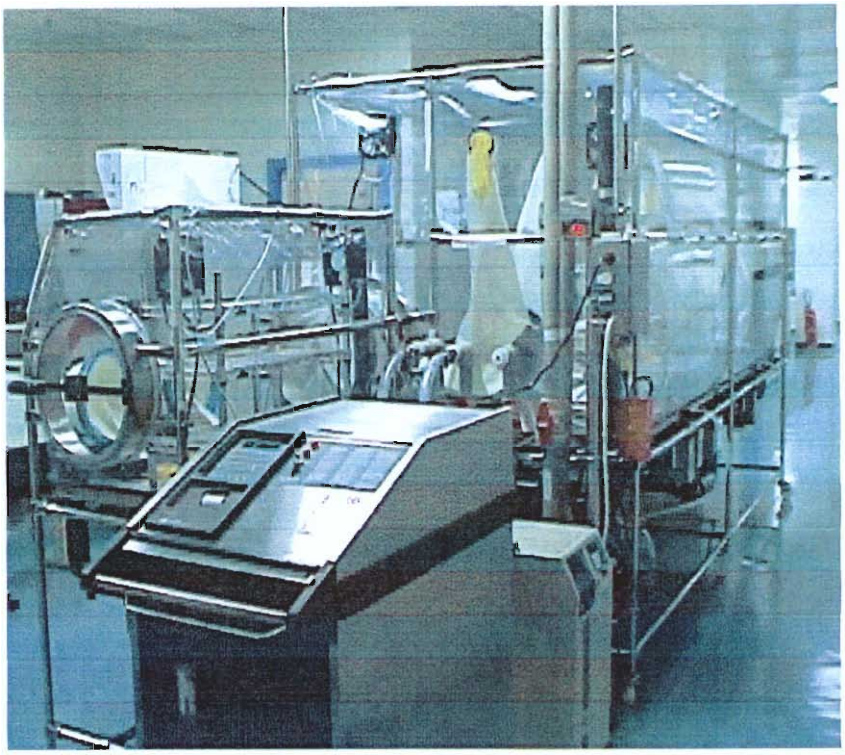
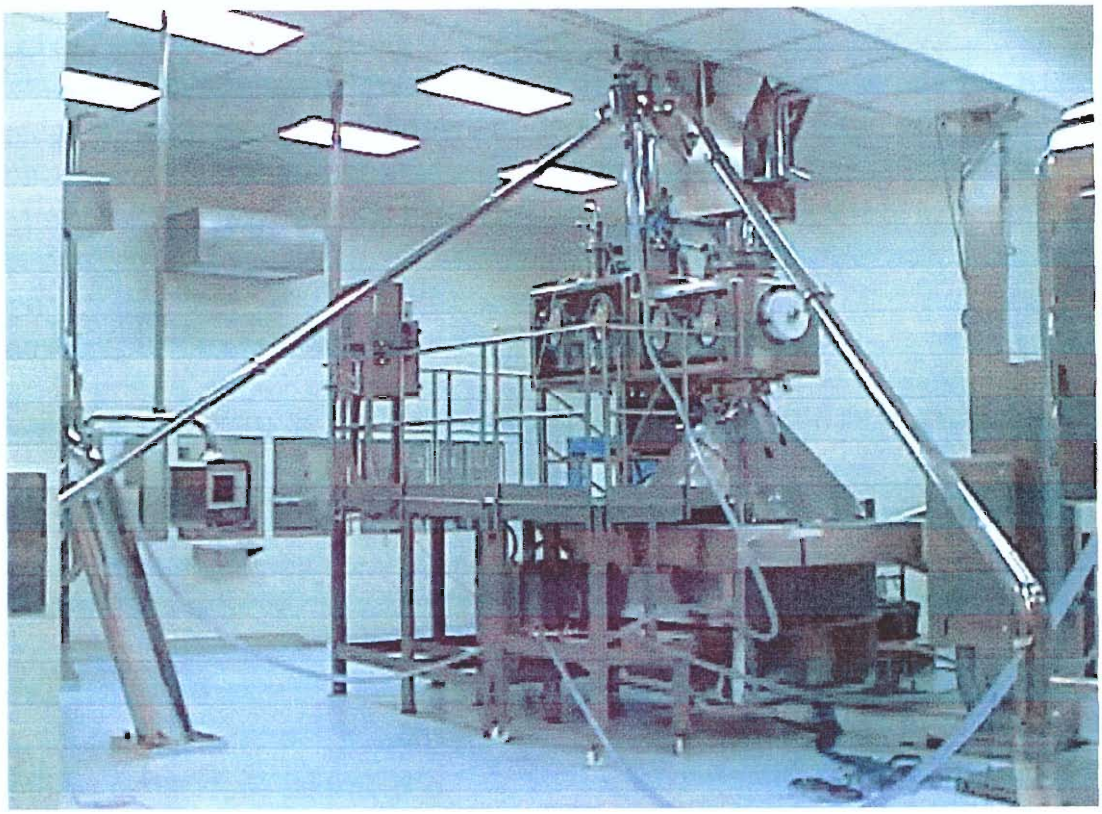


Figura 2 – Exemplo de isolador utilizado para a manufatura de produtos estéreis. Marca Carlisle.



2.2. Vantagens da utilização dos isoladores

Pode-se enumerar uma série de vantagens na utilização de isoladores, entre as quais se destacam o aumento de SAL, aumento da capacidade de trabalho, eliminação de vestimentas estéreis, redução do monitoramento ambiental, contenção de material tóxico, redução do tempo de instalação e start-up, redução do custo de operação e custo associado à área de instalação, viabilidade da aplicação de processo de esterilização, conforme explanado a seguir.

a) Aumento do SAL

Por possibilitar a obtenção de um ambiente esterilizado, os isoladores propiciam a manufatura de produtos estéreis com uma segurança maior, quando comparado à produção destes em salas limpas convencionais, uma vez que se pode atingir um SAL de até 10^{-6} [2,9].

b) Aumento da capacidade de trabalho

Comprovadamente a existência de uma barreira física entre o operador e os materiais estéreis, equipamentos e superfícies de trabalho propicia a execução de atividades laborais de uma forma mais livre[2,9], uma vez que a intervenção humana direta no processo foi eliminada.

c) Eliminação de vestimentas estéreis

Conforme observado por Tim Coles[9] e Agalloco[2], a presença de luvas e vestimentas nos isoladores permite a execução do trabalho pelo operador sem a necessidade da utilização de vestimentas estéreis convencionais, podendo esta ser opcional. Esta possibilidade permite a economia de gastos referentes a manutenção de vestimentas estéreis.

d) Redução do Monitoramento Ambiental

Os procedimentos de esterilização aplicados aos isoladores em conjunto com as barreiras físicas presentes, minimizam a possibilidade da existência de microrganismos em seu interior. Deste modo, a freqüência da realização de monitoramento ambiental dos isoladores quando comparada às salas limpas convencionais é bem inferior. Segundo Agalloco, a realização de monitoramento nos operadores dos isoladores não é necessária, visto que estes não mais tem contato direto com o produto [2,9].

e) Contenção de material tóxico

Como abordado anteriormente, a aplicação dos isoladores é vasta possibilitando inclusive sua utilização para contenção de material tóxico, fornecendo uma maior segurança para os operadores[9, 11, 39].

f) Redução do tempo de instalação e start-up

Tipicamente os isoladores podem ser desenvolvidos e instalados em um tempo inferior quando comparado à preparação e start-up de salas limpas convencionais. Pode-se citar como outra vantagem, a possibilidade da transferência destes equipamentos de uma área para outra, necessitando na maioria das vezes, somente a adequação de linhas de utilidades como gases, vácuo,etc [2,9].

g) Redução do custo de operação e custo associado à área de instalação

Os isoladores possibilitam a manutenção do estado de esterilidade com custo inferior quando comparado às salas limpas convencionais, por permitir dentre outros fatores, um intervalo maior entre uma esterilização e outra. Outro fator que justifica a redução do custo de operação está associada a possibilidade da instalação dos isoladores em área classe 100.000, diferentemente da classe 10.000 preconizada para as salas limpas, cuja freqüência de execução de testes rotineiros é maior [2].

h) Viabilidade do processo de esterilização

Indubitavelmente, a possibilidade da obtenção de uma ambiente isento de contaminação para a manipulação ou produção de produtos estéreis é o principal diferencial da tecnologia dos isoladores[2,9].

2.3. Processos esterilizantes

Conceitualmente, um método de esterilização tem a propriedade de remover ou destruir todas as formas de vida microscópicas, saprófitas ou não, presentes no produto, superfície ou equipamento em questão que seja capaz de se desenvolver durante o armazenamento e utilização do mesmo. Porém, não se pode afirmar que processos destrutivos garantem a morte de todos os microrganismos, e sim a remoção ou morte dos microrganismos de acordo com uma probabilidade na qual pode-se encontrar alguns microrganismos sobreviventes e que não sofreram alterações. Assim sendo, os processos de esterilização visam minimizar esta possibilidade, com o intuito de se obter o "Sterility Assurance Level" (SAL), ou nível de segurança pré-definido[10,45].

Considerando esta premissa, a eficiência do processo de esterilização em termos de SAL dependerá da natureza do produto, equipamento ou superfície e da carga microbiana inicial presente no mesmo[10].

Dentre os métodos de esterilização disponíveis, a esterilização por vapor saturado sob pressão é o mais utilizado dado à ausência de toxicidade, ausência de resíduos, baixo custo, fácil controle, elevado poder esporicida e grande compatibilidade com diversos materiais que apresentam resistência ao calor e à umidade. O mecanismo de ação consiste na desnaturação irreversível de proteínas e enzimas celulares, sendo o tempo médio proposto para a obtenção do poder esterilizante entre 15 a 20 minutos.

Adicionalmente, a utilização de pressão, é um fator extremamente importante para o aumento da temperatura e conseqüentemente para a morte[29].

O processo esterilizante por calor seco, não envolve calor latente e portanto exige a aplicação de temperaturas mais elevadas para se atingir o nível de esterilização requerido. Neste caso, a morte microbiana ocorre por oxidação de constituintes celulares. Este processo é recomendado para materiais que sofram degradação quando são tratados por calor úmido ou que não permitam sua penetração inviabilizando seu uso, como por exemplo produtos oleosos e pós. Podem-se destacar como vantagens deste método o alto poder de penetração, poucas variáveis para se controlar e baixo custo. A maior desvantagem é a de utilizar temperaturas elevadas e tempos geralmente extensos. As temperaturas e tempos recomendados no geral são de 170°C por 60 minutos, 160°C por 120 minutos e 150°C por 150 minutos[29].

Contudo há uma série de produtos e superfícies que são termolábeis e portanto não permitem a utilização dos processos térmicos descritos anteriormente. Em alguns casos, a aplicação de processos de irradiação é totalmente viável, sendo a radiação ionizante, que compreende raios X, alfa, beta, gama prótons, nêutrons e elétrons, uma opção, cuja ação está associada a promoção de efeitos diretos e indiretos devido à reação de estruturas celulares com íons carregados. Também são utilizados raios não ionizantes ultra-violeta, que por possuírem baixo poder de penetração possuem aplicação limitada. Em relação às radiações ionizantes esta afirmação não é verídica,

uma vez que estas possuem um alto poder penetrante, mas com o inconveniente de exigir que seus locais de trabalho sejam revestidos com paredes de concreto de, no mínimo, 2,5m de espessura e revestidos com chumbo e vidro. Os raios gama são os mais utilizados, geralmente emitidos por isótopos radioativos ^{60}Co, ^{137}Ce e ^{182}Ta. As aplicações para este tipo de processo são variadas, podendo-se destacar vitaminas, antibióticos, havendo a necessidade de se verificar possíveis incompatibilidades e criterioso estudo de estabilidade com inclusão de estudo toxicológico, pois podem ocorrer degradações de estruturas em diversas moléculas[37].

A aplicação de agentes químicos para a obtenção de um SAL condizente com a finalidade que equipamentos e materiais se destinam, vem sendo amplamente explorada, dada a possibilidade de sua utilização em materiais que não são termicamente estáveis. Neste caso, o peróxido de hidrogênio sob a forma gasosa, vem conquistando posição de destaque devido a seu baixo custo, facilidade de eliminação e por possuir como produtos de degradação água e oxigênio e por propiciar a esterilização da superfície interna de equipamentos e superfície externa de materiais. É válido lembrar que materiais termolábeis poderiam também ser tratados com óxido de etileno, mas devido a sua séria toxicidade[19], pois possui como produto de decomposição substâncias carcinogênicas, o desenvolvimento de gases esterilizantes mais seguros tem sido uma busca freqüente.

Deve-se ainda ressaltar que o processo de esterilização por filtração também se constitui em uma alternativa para os processos esterilizantes, que não envolve a cinética de morte microbiana, consistindo-se em um processo de remoção mecânica de microrganismos presentes em líquidos, mormente em termolábeis. Este método utiliza membranas de poro de dimensões da ordem de 0,22 a 0,45 micrômetros, geralmente constituídos por materiais poliméricos, como ésteres de celulose. Os materiais utilizados neste processo devem ser previamente esterilizados para garantir a confiabilidade do processo. Adicionalmente, são recomendados testes para a verificação da integridade da membrana, bem como o desafio do poder de retenção microbiana, utilizando-se *Pseudomonas diminuta* [10,21,37].

2.4. Mecanismo de morte dos esporos de *Bacillus* quando do tratamento por peróxido de hidrogênio[28]

Geralmente os esporos das espécies de *Bacillus* são mais resistentes que suas células vegetativas frente a uma variedade de tratamentos, incluindo o calor, pressão, radiação e vários agentes químicos. Entre as substâncias químicas as quais os esporos apresentam uma resistência elevada estão os agentes oxidantes em particular o peróxido de hidrogênio. A resistência do esporo está associada a vários fatores dentre os quais as camadas protéicas, a baixa quantidade de água no córtex do esporo, provavelmente a relativa impermeabilidade da membrana mais interna do esporo e a saturação do DNA do esporo com o grupo de proteínas de ligação de DNA com terminação tipo alfa, beta, proteínas dos esporos solúveis em ácido que bloqueia a danificação do DNA causado pelo peróxido de hidrogênio. O mecanismo de ação do peróxido de hidrogênio está associado a inativação de algumas enzimas, porém, segundo Palop *et al.* 1996, este fato não é o determinante para a morte do esporo.

Há indícios de que quando esporos de *Bacillus subtilis* são eliminados pelo peróxido de hidrogênio, os esporos mantêm sua permeabilidade o que previne o extravasamento do conteúdo do córtex, em particular o ácido dipicolínico (ADP). Esta permeabilidade é mantida mesmo com uma exposição maior dos esporos tratados com o peróxido de hidrogênio ao estresse de tratamento com calor. Uma vez que o maior

fator determinante da permeabilidade do esporo é a integridade de sua membrana mais interna, a ação do peróxido de hidrogênio parece não danificar significantemente sua estrutura. As membranas do esporo possuem pouca quantidade de ácidos graxos polissaturados, normalmente o alvo de ação dos agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio. Deste modo, a morte do esporo tratado com peróxido de hidrogênio difere da observada quando da utilização de outros agentes, como o peroxinitrito, que aparentam causar uma alteração nas propriedades da permeabilidade da membrana mais interna do esporo.

A maior parte dos esporos tratados e eliminados com peróxido de hidrogênio ainda podem germinar normalmente, liberando ADP e aparentemente degradando o córtex do esporo. Assim, a morte do esporo ocasionada pela ação do peróxido de hidrogênio não inativa a ação de proteínas, incluindo os receptores germinantes e as enzimas líticas do córtex.

Embora os esporos mortos pela ação do peróxido de hidrogênio possam iniciar o processo de germinação normalmente, os esporos germinados aparentam ter defeitos metabólicos maiores como normalmente a maioria de componentes de alta energia não são acumulados. Este fato pode estar associado a um número de enzimas chaves do metabolismo que foram inativadas após a ação do peróxido. Deste modo, a morte do esporo ocasionada pela ação de peróxido de hidrogênio é acompanhada pela inativação enzimática e a inativação de pelo menos uma enzima do esporo, a glicose-6-

fosfato desidrogenase. Contudo, outras enzimas metabólicas, em particular várias enzimas glicolíticas, são mais resistentes a inativação pelo peróxido de hidrogênio dentro dos esporos intactos. Outra explicação plausível para a falta de metabolismo em esporo germinados (após tratamento com peróxido de hidrogênio) é a baixa quantidade de água do córtex que não é suficiente para a ação enzimática. Este é o caso dos esporos germinados nos quais a degradação do córtex é bloqueada devido a falta de enzimas líticas ou a presença de um córtex que não seja um substrato para as enzimas líticas. Uma quantidade menor de água no córtex nos esporos germinados após o tratamento com peróxido de hidrogênio é também consistente com o decréscimo na densidade do córtex úmido o que sugere que os esporos não se expandem adequadamente durante o processo de germinação.

2.5. Processo esterilizante pela utilização de peróxido de hidrogênio[44]

O processo de esterilização das superfícies internas dos isoladores e as superfícies externas de materiais encontrados no interior dos mesmos é feita através da aplicação de gás de peróxido de hidrogênio, obtido a partir da vaporização deste agente na forma líquida, na proporção de 35%. O equipamento responsável pela conversão da forma líquida para a gasosa é denominado Gerador de Peróxido de Hidrogênio.

O Gerador de Peróxido de Hidrogênio é um equipamento independente que forma um ciclo fechado com o isolador a ser esterilizado. Utiliza ar filtrado, através de Filtros HEPA, como um transportador do gás de peróxido de hidrogênio. O processo de esterilização ocorre próximo à pressão atmosférica, mas a pressão é freqüentemente maior (positiva) em relação à área adjacente aos isoladores, quando da aplicação para operações assépticas. A natureza oxidativa do peróxido de hidrogênio é a responsável pelo mecanismo de letalidade.

O gás de peróxido de hidrogênio é continuamente injetado durante um período pré-determinado, apropriado para garantir a esterilização. Após sua saída do isolador, o peróxido é convertido cataliticamente a vapor de água e oxigênio. O vapor de água é armazenado no sistema de secagem do Gerador (sistema dessecante bi-molecular).

O processo de esterilização consiste de quatro fases: desumidificação, condicionamento, esterilização e aeração.

a) Fase de Desumidificação: o ar seco e filtrado por filtros HEPA é circulado para o interior dos isoladores com o intuito de reduzir a umidade a níveis pré-determinados (geralmente 20% de umidade relativa a 25 °C). Isto permite que a concentração necessária de peróxido de hidrogênio seja mantida nos níveis de saturação, ou abaixo durante as fases de condicionamento e esterilização. O tempo para se atingir a umidade desejada varia de acordo com o volume do isolador. Durante esta fase também ocorre o aquecimento da temperatura das superfícies internas do isolador, permitindo a obtenção de uma maior concentração de peróxido de hidrogênio.

b) Fase de Condicionamento: ar seco e filtrado através de filtro HEPA continua a ser utilizado enquanto gás de peróxido de hidrogênio é injetado juntamente a este. A velocidade de injeção é controlável podendo variar de 2 a 10 gramas por minuto. A fase de condicionamento permite atingir a concentração desejada para o processo de esterilização mais rapidamente, sendo que o tempo de condicionamento é afetado pela velocidade de injeção de peróxido de hidrogênio e pelo volume do isolador.

c) Fase de Esterilização – um fluxo constante da mistura de gás peróxido de hidrogênio e ar filtrado por filtro HEPA é mantido a uma velocidade de injeção pré-estabelecida.

d) Fase de Aeração – a injeção do gás de peróxido de hidrogênio é interrompida e a recirculação de ar seco filtrado iniciada, com a finalidade de se reduzir a concentração de gás de peróxido de hidrogênio no interior dos isoladores.

Figura 3 – Exemplo do equipamento utilizado para a conversão do peróxido de hidrogênio da forma líquida para gás. Marca Steris, modelo VHP 1000

2.6. Particularidades da utilização do processo de esterilização por peróxido de hidrogênio em isoladores

A necessidade da comprovação prática da eficiência do ciclo de esterilização por peróxido de hidrogênio requer a execução de desafios com indicador biológico. O mais indicado para tal finalidade é o *Bacillus stearothermophilus*, na concentração de 10^6 UFC por unidade. Entretanto, a condução de estudos adicionais para a comprovação de que este monitor biológico é o mais indicado, certificando-se que o material utilizado como suporte é compatível quimicamente com a agente esterilizante, e em paralelo a comprovação que microrganismo em teste possui resistência superior quando comparado aos microrganismos da microbiota da área na qual o isolador se encontra instalado, fornece dados que suportam cientificamente a aquisição de monitores biológicos preparados por instituições terceirizadas.

A execução de testes com os diversos materiais normalmente presentes no interior dos isoladores, e que portanto estão susceptíveis a ação do peróxido de hidrogênio, permite também a avaliação da compatibilidade deste materiais quando da exposição ao agente esterilizante.

3. OBJETIVO

Assegurar que o emprego do indicador biológico comercial *Bacillus stearothermophilus*, ATCC12980, em suporte de aço inoxidável, utilizado para a certificação do processo de esterilização de superfícies internas de isoladores e externa de materiais neles presente, quando do uso de peróxido de hidrogênio como agente esterilizante, é seguramente o mais indicado para tal finalidade por apresentar resistência microbiológica superior aos microrganismos usualmente encontrados na microbiota da área produtiva.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

Foi objeto deste estudo a utilização de peróxido de hidrogênio sob a forma gasosa, obtido a partir da vaporização deste material líquido, fornecido sob a marca AMSCO, em recipientes plásticos de um (1) litro, na proporção de 35%. A conversão da forma física líquida para gasosa deu-se através da utilização do equipamento gerador de vapor de peróxido de hidrogênio também da Amsco/Steris, comercialmente denominado VHP ou VHP1000.

Para viabilizar os estudos de letalidade, foi executado numa primeira instância, a caracterização dos microrganismos mais incidentes e representativos da área produtiva, denominada Cristalização Estéril, na qual os isoladores se encontram fisicamente. Paralelamente foram selecionados os tipos de materiais presentes nas superfícies que seriam tratadas pelo agente esterilizante peróxido de hidrogênio, que possivelmente serviriam como suportes.

4.2 Método

4.2.1 Determinação dos microrganismos representativos da microbiota da área produtiva

Logo após a conclusão das etapas de edificação da área de Cristalização Estéril, na qual os isoladores foram instalados, iniciou-se a coleta de dados, tomando-se por base o Programa de Monitoramento Ambiental, o qual foi estipulado de acordo com as instruções do Federal Standard 209E[35] em fase *at rest*, com posterior amostragem nas condições *as built*, *at rest* e em operação ou *dymanic*, em conformidade com as recomendações do Institute of Environmental Sciences and Technology – Contamination Control Division.

Durante a fase *as built*, as amostragens foram executadas após a realização dos procedimentos de limpeza, que tem como objetivo nesta etapa a remoção física de eventuais sujeiras, mediante a utilização de detergentes e acessórios adequados. Porém, deve-se considerar que esta prática de limpeza poderia ser alterada, uma vez que os equipamentos ainda estavam por ser instalados, e que poderiam contribuir com contaminação. Adicionalmente, as etapas de qualificação de instalação e operação do sistema de ar condicionado deveriam ainda ser processadas.

Na fase *at rest*, as amostragens sucederam-se durante a qualificação da área, considerando-se os procedimentos de limpeza, assepsia, vestimenta, dentre outros.

A caracterização e quantificação das partículas viáveis, exige a utilização de meios de cultura seguida de incubação a temperatura de 20-25°C por 2 dias, com subseqüente transferência para a temperatura de 30-35°C por 3 dias, totalizando 5 dias. O meio de cultura utilizado para este fim, foi o Agar Caseína Soja (Difco) acrescido de 0,1% de Lecitina de Soja e 0,7% de polissorbato 80 com a finalidade de inativar possíveis resíduos de sanitizantes, e 10 mL de penicilinase, para cada litro de meio preparado para a inativação de possíveis resíduos de antibióticos cefalosporínicos.

A preparação do meio deu-se de acordo com as instruções do fabricante, sendo: para cada 1 litro de meio a ser preparado, foram pesados 40 g de pó, 1 g de lecitina de soja e 7 g de polissorbato 80, que foram transferidos para um balão de fundo chato, com capacidade de pelo menos 2 litros, para possibilitar a agitação. Os ingredientes, exceto a penicilinase, foram solubilizados em 1 litro de água para injeção à temperatura de aproximadamente 50°C e foram fervidos até a completa dissolução. Na seqüência, os balões foram transferidos para a autoclave do laboratório microbiológico, cujo ciclo de esterilização fora previamente validado, a fim de serem submetidos ao processo de autoclavação. Após a finalização desta etapa, os balões com tampas foram encaminhados ao fluxo laminar, resfriados, e nestes foi adicionado 1 mL da penicilinase, previamente certificada em relação a sua atividade, mediante a

utilização de seringa, agulha e filtro Milex® estéreis. Posteriormente, distribui-se em placas de Petri estéreis vazias, porções do meio de cultura ainda liquefeito sob fluxo laminar, as quais após solidificação, foram invertidas e incubadas à temperatura de 20-25°C por 2 dias e posteriormente à 30-35°C por mais 3 dias (total 5 dias), com o intuito de se certificar a utilização de placas não contaminadas durante o estudo. Em paralelo, processou-se a verificação da viabilidade do meio de cultura, pela inoculação em duplicata de 1mL de suspensão dos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtillis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, na concentração de 10 a 100 UFC/mL, processando a incubação à temperatura de 20-25°C por até 7 dias, e à 30-35°C por até 3 dias, sendo o critério de aceitação, observação do crescimento entre 10-100 UFC por placa.

Processou-se avaliação de partículas viáveis por amostragem ativa e passiva de ar e superfícies de equipamentos e piso. A amostragem de ar ativa deu-se pela sucção de ar, pela utilização de equipamento destinado para este fim. A amostragem de ar passivo processou-se através da utilização de exposição de placas de Petri contendo meio de cultura, por um período de 4 horas, através da sedimentação gravitacional, tendo por finalidade a avaliação qualitativa. Já as de superfícies, ocorreram nos equipamentos e pisos contidos na área produtiva.

4.2.1.1 Amostragem passiva de ar para partículas viáveis

Foram expostas placas de exposição no ambiente adjacente aos isoladores, contendo como meio nutritivo Agar Caseína Soja por um período de 4 horas, seguida de incubação a temperatura de 20-25°C por 2 dias, com subseqüente transferência para a temperatura de 30-35°C por 3 dias, totalizando 5 dias.

4.2.1.2 Amostragem ativa de ar para partículas viáveis

Utilizou-se o equipamento da marca PBI, modelo SAS Super 90, programando a amostragem de ar para 500 litros na área Classe B ou 10.000, que circunda os isoladores.

4.2.1.3 Amostragem de superfície para partículas viáveis

Executou-se a amostragem das superfícies dos equipamentos, inclusive dos isoladores e piso, mediante a utilização de placas de contato Rodac® que foram submetidas às mesmas condições de incubação descritas no item 4.2.1.1.

4.2.3 Determinação do carreador/suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico

Este estudo tem como finalidade avaliar a capacidade microbiocida do gás de peróxido de hidrogênio em diversos materiais rotineiramente utilizados na área produtiva e que são passíveis de esterilização por este agente. Também determinar a natureza de material indicado para servir como suporte do microrganismo/indicador biológico a ser utilizado nos testes de desafio.

4.2.3.1 Procedimento

a) Preparou-se cerca de 400 tubos de ensaio contendo 10 mL do meio caldo Caseína Soja, de acordo com as instruções preconizadas pelo fabricante Difco: para cada 1 litro de meio a ser preparado, dissolveu-se 30 g do meio liofilizado em água para injeção, em balão de fundo chato. Promoveu-se a agitação do balão até que foi observada a dissolução completa. Posteriormente, transferiu-se 10 mL do meio preparado para tubos de ensaio com tampa rosqueável, que foram postos em estantes de aço inoxidável e foram submetidos ao processo de autoclavação (processo validado para este fim). Após o término do ciclo da autoclave, as estantes com os tubos foram submetidas a incubação à temperatura de 20 a 25°C por 2 dias, com subseqüente incubação à temperatura

de 30 a 35°C por 3 dias, a fim de garantir que unidades possivelmente não estéreis fossem descartadas antes de sua utilização.

b) Preparou-se cupons de diversos materiais (30 cupons para cada tipo), dimensões 2x2 cm, que são os representativos dos materiais rotineiramente utilizados na área produtiva e se encontram no interior dos isoladores, e portanto, submetidos ao processo de esterilização pelo peróxido de hidrogênio. A Tabela 2 abaixo apresenta os diversos materiais sua aplicabilidade.

Tabela 1 - Descrição dos diversos tipos de materiais comumente encontrados no interior dos isoladores e seu emprego.

Item	Descrição - Emprego
Silicone	Anel de silicone utilizado para vedação do vidro/janela dos isoladores
Hypalon	Material constituinte das luvas e mangas-luvas dos isoladores
Vidro	Material da janela dos isoladores
Cloropel-Kevlar-Cloropel (CKC)	Material constituinte da escafandra (Half-Suit)
Teflon	Anel para conexões sanitárias
Polipropileno	Material constituinte da RTP (Porta de Transferência Rápida)
Aço Inoxidável	Material constituinte dos isoladores, material do carreador do microrganismo teste –comercial
Latéx	Luvas (alternativa)
Nylon	Bolsa autoclavavél
PVC	Half-Suit (escafandra), tubos flexíveis

Saco de alumínio	Saco utilizado para o acondicionamento de materiais produzidos na área produtiva

c) Após a confecção dos cupons, preparou-se uma solução de álcool isopropílico a 70% e permitiu-se o contato dos cupons com este agente esterilizante por uma hora, sob fluxo laminar, com a finalidade de se reduzir a carga microbiana, para posterior inoculação do microrganismo teste. Decorrido o tempo de contato, retirou-se os cupons da solução e transferiu-se os mesmos para um tecido estéril, depositado na bancada do fluxo laminar, com o intuito de permitir sua secagem.

d) Sob fluxo laminar, preparou-se a suspensão de *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^6 em 0,01mL através da diluição da suspensão comercial do fornecedor Apex Labs, com carga microbiana inicial de 2,0 x 10^7/0,01mL, pipetando-se 1mL da suspensão Apex para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água para injeção previamente obtida por processo de autoclavação,utilizando-se pipeta calibrada.

e) Agitou-se o tubo de ensaio e fez-se diluições seriadas para a certificação da concentração de 10^6 UFC/0,01 mL utilizadas no teste. Para tal, pipetou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri estéreis e identificadas (em duplicata), vertendo em seguida meio de cultura Agar Caseína Soja liquefeito. Processou-se a homogeneização e permitiu-se a solidificação do meio.

f) As placas foram envolvidas por sacos plásticos, invertidas e submetidas à incubação à temperatura de 55 a 60°C por 2 dias para posterior contagem. A utilização dos sacos plásticos se faz necessário para se evitar a perda excessiva de umidade do meio de cultura e conseqüente perda de sua capacidade nutritiva.

g) Para cada tipo de material, separou-se 24 cupons , sendo que:

- Em 20 cupons inoculou-se, sob fluxo laminar, 0,01 mL de *Bacillus stearothermophilus*, na concentração de 10^6UFC/0,01mL , utilizando-se a diluição correspondente, e permitiu-se a completa secagem.
- Os 4 cupons restantes, foram identificados como controles positivos (2 cupons) e como controle negativo (2 cupons).

h) Em recipientes com tampa os cupons inoculados, bem como os controles positivos e negativos, foram dispostos e na seqüência foram tampados. Como medida adicional, os recipientes foram vedados com Parafilm®. Preparou-se um recipiente para cada tipo de material.

i) Identificou-se tubos de ensaio contendo meio de cultura Caldo Caseína Soja, para cada material por intervalo de tempo e para os controles negativos e positivos, e estes foram dispostos em estantes de tubos de ensaio.

j) Colocou-se os recipientes e as estantes de tubos de ensaio no interior do isolador e iniciou-se o ciclo de esterilização por peróxido de hidrogênio, através da utilização do Gerador de Peróxido de Hidrogênio, utilizando os parâmetros descritos abaixo. No mesmo instante, o equipamento que mede a concentração de peróxido de hidrogênio presente no interior do isolador foi acionado.

Tabela 2 - Parâmetros do ciclo de VHP utilizado no teste de compatibilidade dos materiais encontrados no interior dos isoladores frente a exposição ao peróxido de hidrogênio

Parâmetros do Ciclo	Valores Programados
Volume isolador (pé cúbico)	20
Fluxo de Ar Fase Desumidificação (pé cúbico/min)	18
Fluxo Ar Fase Condicionamento (pé cúbico/min)	18
Fluxo Ar Fase Esterilização (pé cúbico/min)	15
Fluxo Ar Fase Aeração (pé cúbico/min)	18
Desumidificar até (mg/l)	4.6
Taxa de Injeção Fase Condicionamento (g/min)	4.9
Taxa Injeção Fase de Esterilização (g/min)	2.8
Tempo de Desumidificação (horas:min)	0:15
Tempo de Condicionamento (horas:min)	0:02
Tempo de Esterilização (horas:min)*	5:00
Tempo de Aeração (horas:min)	1:00

*Este tempo foi programado a fim de permitir a condução do estudo para todos os tipos de materiais.

k) Após duas horas do início da fase de esterilização (tempo conservador necessário para permitir um equilíbrio de concentração dentro do isolador), retirou-se o Parafilm® e a tampa de um dos recipientes, no tempo tido como zero. Nos intervalos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 minutos, removeu-se um par do cupom com o respectivo microrganismo sob desafio, e com o auxílio de uma pinça, esterilizada

após cada uso por meio da utilização do equipamento Bacticinerator®, instalado temporariamente no interior do isolador para este fim, transferiu-se 1 cupom para um (1) tubo de ensaio que continha o meio de cultura Caldo Caseína Soja, de acordo a identificação apropriada (o mesmo procedimento foi aplicado para os outros cupons). Fez-se o mesmo para os cupons relativos ao controle negativo e controle positivo e repetiu-se esta operação até que todo os materiais fossem testados.

l) Após o término do ciclo programado pelo VHP, transferiu-se as estantes com os tubos de ensaio para a incubadora à temperatura de 55 a 60°C, previamente qualificada, durante o período de no mínimo sete (7) dias. Nos tubos identificados como controle positivo, inoculou-se de 10 a 100 UFC/1 mL da suspensão de *Bacillus stearothermophilus*, obtida previamente conforme descrito no item d), sendo também incubados à temperatura e período acima citados.

m) Decorrido o tempo de sete (7) dias de incubação, observou-se os tubos de ensaio contendo os cupons. Foram considerados resultados negativos, aqueles nos quais os 2 tubos apresentavam-se isentos de contaminação sendo este o tempo necessário para se eliminar 10^6 células de *Bacillus stearothermophilus*, denominado **"T"**.

n) Na seqüência, anotou-se o log da população do indicador biológico, baseando-se na contagem inicial (chamado "L").

o) Calculou-se o valor D experimental, conforme fórmula de Stumbo-Murphy-Cochran[39]:

T"/("L" - LOG lnN/q)
ln = Natural Log,
N = número de unidades testadas
e q = número de unidades estéreis

p) Por último, comparou-se o Valor D para os materiais em relação ao aço inoxidável.

4.2.4 Determinação do microrganismo mais resistente a ser utilizado como indicador biológico

Este teste tem como finalidade a determinação do valor D dos isolados da microbiota normal e do *Bacillus stearothermophilus* frente a sua exposição à ação microbiocida do gás de peróxido de hidrogênio e a determinação do microrganismo mais resistente à ação deste agente.

4.2.4 .1 Procedimento

a) Preparou-se suspensões de células dos organismos da microbiota normal de 10^4 de células viáveis/1 mL utilizando a seguinte técnica:

a.1 Fez-se estrias com os microrganismos isolados da microbiota normal em placas de Petri contendo meio de cultivo Agar Caseína Soja. Incubou-se as placas invertidas em temperatura apropriada sendo 20 a 25°C para fungos e leveduras e 30 a 35°C por no mínimo de 2 dias.

a.2 Usando uma alça estéril, ou equivalente, removeram-se as colônias dos isolados e transferiu-se as mesmas para um tubo de ensaio contendo solução tampão fosfato.

a.3 Com auxílio de um Vórtex, agitou-se cada tubo e na seqüência, e realizou-se diluições decimais seriadas para determinar qual tubo/diluição continha a concentração de 10^4 células viáveis/1 mL.

b) Sob fluxo laminar, preparou-se suspensões de *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^2 UFC em 0,01mL através da diluição da suspensão comercial do fornecedor Apex Labs, na concentração inicial de 2,0 x 10^7/0,01mL, pipetando-se 1mL da suspensão Apex para um tubo de ensaio

contendo 9 mL de água para injeção previamente obtida por processo de autoclavação,utilizando-se pipeta calibrada.

c) Agitou-se o tubo de ensaio e fez-se diluições seriadas para a certificação da concentração de 10^2 UFC/0,01 mL utilizadas no teste. Para tal, pipetou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri estéreis e identificadas (em duplicata), vertendo em seguida meio de cultura Agar Caseína Soja liquefeito.

d) Processou-se a homogeneização e permitiu-se a solidificação do meio. As placas foram envolvidas por sacos plásticos, foram invertidas e submetidas à incubação à temperatura de 55 à 60°C por 2 dias para posterior contagem. Armazenou-se os tubos com as suspensões sob refrigeração até o momento do uso.

c. Sob fluxo laminar, inoculou-se 0,01mL da suspensão de a 10^2 UFC/0,01mL de cada microrganismo em cupons de aço inoxidável, previamente esterilizados por tratamento de calor seco a 250°C por 2 horas, utilizando uma micropipeta calibrada. Colocou-se os cupons inoculados e 4 cupons não inoculados em um recipiente com tampa, fechando-o e vedando-o com Parafilm®. Usou-se um recipiente para cada microrganismo em teste. Dois dos 4 cupons não inoculados foram utilizados como controles negativos e os dois remanescentes foram usados como controles positivos, com o intuito de

se certificar que o cupom de aço inoxidável não inibia o crescimento microbiano. Colocou-se os recipientes dentro do isolador e processou-se o ciclo de esterilização por peróxido de hidrogênio adequado.

d. Colocou-se tubos contendo meio de cultura Caldo Caseína Soja identificados pelo microrganismo em teste e intervalo de tempo, bem como controles positivos e negativos, dentro do isolador para terem suas superfícies externas esterilizadas. Estes tubos foram utilizados para a inoculação do indicador biológico em teste e controles positivos e negativos .

e. Executou-se o ciclo de esterilização com os parâmetros descritos na tabela 2 e no mesmo instante, o equipamento que mede a concentração de peróxido de hidrogênio presente no interior do isolador foi acionado.

f. Após 2 horas do início da fase de esterilização, removeu-se o Parafilm® e a tampa do recipiente (este é considerado o tempo zero). Nos intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 e 24 minutos, , com o auxílio da luva do isolador, transferindo-o para um tubo de ensaio cada, que continha o meio de cultura Caldo Caseína Soja, de acordo a identificação apropriada. Repetiu-se esta operação até que todo os materiais fossem testados.

g. Após a conclusão deste procedimento para todos os microrganismos por intervalo de tempo e término do ciclo de esterilização, transferiu-se 2 cupons para 2 tubos distintos contendo Caldo Caseína Soja identificados como "Controle Negativo" e os 2 cupons restantes para 2 tubos distintos contendo Caldo Caseína Soja identificados como "Controle Positivo" .

h. Repetiu-se os passos "e" à "f" para todos os microrganismos.

i. Quando do término do ciclo de esterilização, removeu-se as estantes contendo os tubos de ensaio e incubou-se as mesmas nas temperaturas indicadas na tabela 3 abaixo, durante o período de sete dias.

Tabela 3 – Condições de incubação dos microrganismos veiculados em suporte de aço inoxidável (isolados da microbiota)

Microrganismo	Temperatura de Incubação
Bacillus sp	30 a 35°C
Micrococcus luteus	30 a 35°C
Corynebacterium	20 a 25°C
Staphylococcus sp	30 a 35°C
Penicillium	20 a 25°C
Bacillus stearothermophilus	50 a 55°C

j. Nos tubos identificados como "Controle Positivo" , inoculou-se de 10 à 100 UFC/mL, para cada organismo em teste (microbiota normal ou *Bacillus stearothermophilus*), em dois tubos distintos identificados como "controle positivo" e incubou-se os mesmos às temperaturas apropriadas (20 a 25, 30 a 35, 50 a 55°C), por no máximo sete dias.

k. Após 7 dias de incubação, observou-se os tubos que continham os cupons. Anotou-se em qual intervalo os 2 tubos permaneceram sem crescimento microbiano (tempo necessário para reduzir aproximadamente 10^2 células viáveis ("**T**").

l. Na seqüência, anotou-se o log da população do indicador biológico, baseando-se na contagem inicial ("**L**").

m. Calculou-se o valor D experimental, conforme fórmula de Stumbo-Murphy-Cochran[39]:

T"/("L" - LOG lnN/q)
ln = Natural Log,
N = número de unidades testadas
e q = número de unidades estéreis

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

O emprego de isoladores na indústria farmacêutica para a realização de teste de esterilidade, bem como para a utilização no processo de manufatura de medicamentos, vem ganhando uma maior participação nas últimas décadas, devido a minimização da interferência humana e possibilidade de se ter um ambiente estéril. Tais equipamentos, que tem a propriedade de isolar o ambiente de trabalho de possíveis interferências do operador, podem ser submetidos a tratamento de agentes esterilizantes, cujo SAL é de 10^{-6}, diferentemente do esperado para processos assépticos, cujo SAL é de 10^{-3} [23].

Devido a características particulares do peróxido de hidrogênio, tais como fácil remoção após sua aplicação sob a forma de vapor (por apresentar como produtos de degradação água e oxigênio), grande compatibilidade com a maioria dos materiais comumente utilizados em áreas produtivas, bem como seu custo relativamente baixo, é o agente preferencialmente escolhido para o tratamento do interior de isoladores e materiais neles contidos.

Entretanto, para se assegurar que o tratamento com o peróxido de hidrogênio nos isoladores não acarretaria problemas de incompatibilidade entre este agente e os materiais de constituição deste equipamento, propôs-se o estudo de determinação do Valor D do *Bacillus stearothermophilus* veiculados em diferentes materiais contidos no interior dos isoladores, frente ao aço inoxidável, material este comumente utilizado

como suporte para obtenção de indicador biológicos e principal material constituinte deste equipamento. Deste modo, suportes destes materiais foram preparados, tendo como inóculo o microrganismo *Bacillus stearothermophilus*.

5.1 Estudo dos microrganismos mais incidentes na Área Produtiva

Para propiciar a avaliação dos tipos de microrganismo presentes na Área Produtiva, preparou-se a Tabela 4 (sem discriminação de classe) e Figura 4 (com discriminação de classe).

Os cálculos de porcentagem presentes na Tabela 4 foram executados m função do total de pontos em que foi observado algum microorganismo, enquanto que as porcentagens da Figura 4 foram determinadas baseando-se no total de pontos inspecionados para cada classe.

Os microrganismos mais incidentes foram: *Bacillus sp, Micrococcus luteus, Corynebacterium, Staphylococcus sp, Penicillium sp.*

Tabela 4 - Microrganismos presentes nos pontos estudados por ordem de importância

Microrganismo	%
Bacillus sp	26,91
Staphylococcus sp	19,42
Corynebacterium	13.37
Micrococcus luteus	3,16

Nota: inclui-se o *Penicillium sp* no estudo de comparação do Valor D para se ter um representante de fungo.

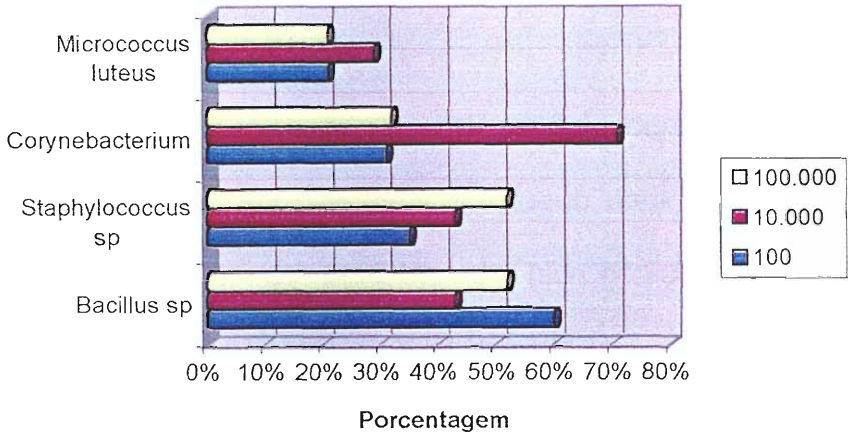


Figura 4 - Microrganismos encontrados em salas classe 100, 10.000 e 100.000

5.2. Determinação do carreador/suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico

a) Monitoramento da concentração de VHP durante o ciclo

Tabela 5 - Concentração de VHP medida durante o ciclo de esterilização para a determinação do suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico com a utilização de peróxido de hidrogênio e *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^6 UFC/0,01ml (corrida 1)

Tempo (horas após início Fase Esterilização)	Concentração de VHP medido pelo Draeger Polytron (ppm)
0	30
1	1465
2*	1655
3	1710
4	1700
5	1620

* Início do experimento

Tabela 6 - Concentração de VHP medida durante o ciclo de esterilização para a determinação do suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico com a utilização de peróxido de hidrogênio e *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^2 UFC/0,01ml (corrida 2)

Tempo (horas após início Fase Esterilização)	Concentração de VHP medido pelo Draeger Polytron (ppm)
0	20
1	1465
2*	1670
3	1705
4	1660
5	1605

* Início do experimento

Tabela 7 - Concentração de VHP medida durante o ciclo de esterilização para a determinação do suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico com a utilização de peróxido de hidrogênio e *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^2 UFC/0,01ml (corrida 3)

Tempo (horas após início Fase Esterilização)	**Concentração de VHP medido pelo Draeger Polytron (ppm)**
0	20
1	1465
2*	1660
3	1700
4	1680
5	1615

* Início do experimento

Nota: a corrida 3 foi executada para se confirmar os dados da corrida 2 para o material silicone.

b) Número de colônias presentes na suspensão de *Bacillus stearothermophilus* utilizada nos experimentos

Tabela 8: Concentração da suspensão de *Bacillus stearothermophilus* utilizado na determinação do suporte mais adequado para a veiculação do indicador biológico com utilização de peróxido de hidrogênio.

Corrida	Concentração em UFC/0,01mL
1	$1,2 \times 10^6$
2	560
3	490

Nota:

Quando da inoculação de 10^6 de *B. stearothermophilus* em materiais elastoméricos e poliméricos, uma pequena gota é formada devido a natureza hidrofóbica dos materiais, como também fora observado por Inoe[22] em seu experimento. Esta gota ou pequena aglomeração resulta em uma formação teórica de várias camadas de esporos que dificultam a ação do peróxido de hidrogênio impactando o estudo de Valor D, não possibilitando a obtenção de dados acurados. Uma vez que esta aglomeração não pode ser evitada na maioria dos materiais, um inóculo com menor concentração foi utilizado para minimizar a formação de várias camadas de células. Isto não impacta o objetivo principal deste estudo, uma vez que para todos os materiais o inóculo será constante.

c) Determinação do valor D dos materiais

Valor D experimental "T"/("L" – LOG lnN/q)

Corrida 1

a) PVC

Tempo "T": >8 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 8/(6,08 – LOG ln2/0) = 8/(6,08 – (-0,16)) = 8 / 6,24= >1,28

b) Aço inoxidável

Tempo "T": >8 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 8/(6,08 – LOG ln2/0) = 8/(6,08 – (-0,16)) = 8 / 6,24= >1,28

c) CKC

Tempo "T": 6 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 6/(6,08 – LOG ln2/0) = 6/(6,08 – (-0,16)) = 6 / 6,24= 0,96

d) Teflon

Tempo "T": 1 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 1/(6,08 – LOG ln2/0) = 1/(6,08 – (-0,16)) = 1 / 6,24= 0,16

e) Polipropileno

Tempo "T": 8 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 8/(6,08 – LOG ln2/0) = 8/(6,08 – (-0,16)) = 8 / 6,24= 1,28

f) Látex

Tempo "T": >8 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 8/(6,08 – LOG ln2/0) = 8/(6,08 – (-0,16)) = 8 / 6,24= >1,28

g) Silicone

Tempo "T": >8 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 8/(6,08 – LOG ln2/0) = 8/(6,08 – (-0,16)) = 8 / 6,24= >1,28

h) Hypalon

Tempo "T": >8 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 8/(6,08 – LOG ln2/0) = 8/(6,08 – (-0,16)) = 8 / 6,24= >1,28

i) Vidro

Tempo "T": >8 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 8/(6,08 – LOG ln2/0) = 8/(6,08 – (-0,16)) = 8 / 6,24= >1,28

j) Nylon

Tempo "T": >8 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 8/(6,08 – LOG ln2/0) = 8/(6,08 – (-0,16)) = 8 / 6,24= >1,28

k) Saco de Alumínio

Tempo "T": >8 min

"L":log 1,2 x 10^6 = 6,08

Valor D experimental: 8/(6,08 – LOG ln2/0) = 8/(6,08 – (-0,16)) = 8 / 6,24= >1,28

Corrida 2

a) PVC

Tempo "T": 0,17 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 0,17/(2,75 – LOG ln2/0) = 0,17/(2,75 – (-0,16)) = 0,17 / 2,91= 0,06

b) Aço inoxidável

Tempo "T": 0,17 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 0,17/(2,75 – LOG ln2/0) = 0,17/(2,75 – (-0,16)) = 0,17 / 2,91= 0,06

c) CKC

Tempo "T": 0,17 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 0,17/(2,75 – LOG ln2/0) = 0,17/(2,75 – (-0,16)) = 0,17 / 2,91= 0,06

d) Teflon

Tempo "T": 0,17 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 0,17/(2,75 – LOG ln2/0) = 0,17/(2,75 – (-0,16)) = 0,17 / 2,91= 0,06

e) Polipropileno

Tempo "T": 0,17 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 0,17/(2,75 – LOG ln2/0) = 0,17/(2,75 – (-0,16)) = 0,17 / 2,91= 0,06

f) Látex

Tempo "T": 0,17 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 0,17/(2,75 – LOG ln2/0) = 0,17/(2,75 – (-0,16)) = 0,17 / 2,91= 0,06

g) Silicone

Tempo "T": 2 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 2/(2,75 – LOG ln2/0) = 2/(2,75 – (-0,16)) = 2 / 2,91= 0,69

h) Hypalon

Tempo "T": 0,17 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 0,17/(2,75 – LOG ln2/0) = 0,17/(2,75 – (-0,16)) = 0,17 / 2,91= 0,06

i) Vidro

Tempo "T": 0,17 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 0,17/(2,75 – LOG ln2/0) = 0,17/(2,75 – (-0,16)) = 0,17 / 2,91= 0,06

j) Nylon

Tempo "T": >8 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 8/(2,75 – LOG ln2/0) = 8/(2,75 – (-0,16)) = 8 / 2,91= >2,75

k) Saco de Alumínio

Tempo "T": 0,17 min

"L":log 560 = 2,75

Valor D experimental: 0,17/(2,75 – LOG ln2/0) = 0,17/(2,75 – (-0,16)) = 0,17 / 2,91= 0,06

Corrida 3

a) Silicone

Tempo "T": 0,17 min
"L":log 490 =1,60
Valor D experimental: 0,17/(1,60 – LOG ln2/0) = 0,17/(1,60 – (-0,16)) = 0,17 / 1,76= 0,10

Tabela 9: Letalidade do *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^6 UFC/0,01mL veiculados em suportes de diversas naturezas presentes no interior de isoladores após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio. (Corrida 1)

		Tempo em minutos necessário para eliminação do *B. stearothermophilus*		**Controle negativo**		**Controle positivo**	
	Réplicas	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Materiais em teste	PVC	>8	>8	+	-	+	+
	Aço inoxidável	8	8	+	+	+	+
	CKC	6	6	-	-	-	-
	Teflon	2	2	-	-	+	+
	Polipropileno	8	8	-	-	+	+
	Látex	>8	>8	+	+	+	+
	Silicone	>8	>8	+	+	+	+
	Hypalon	>8	>8	-	-	+	+
	Vidro	>8	8	+	-	+	+
	Nylon	>8	>8	+	+	+	+
	Saco de alumínio	>8	8	-	-	+	+

Nota:

a) A sigla CP significa "Controle Positivo". O símbolo "+" corresponde ao resultado positivo, isto é, quando se observa crescimento microbiano após sete dias de incubação.

b) A sigla CN significa "Controle Negativo". O símbolo "-" corresponde ao resultado negativo, isto é, não se observa crescimento microbiano após sete dias de incubação.

Tabela 10: Letalidade do *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^2 UFC/0,01mL veiculados em suportes de diversas naturezas presentes no interior de isoladores após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio. (Corrida 2)

		Tempo em minutos necessário para eliminação do *B. stearothermophilus*		**Controle negativo**		**Controle positivo**	
	Réplicas	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Materiais em teste	PVC	<0,17	<0,17	-	-	+	+
	Aço inoxidável	<0,17	<0,17	-	-	+	+
	CKC	<0,17	<0,17	-	-	+	+
	Teflon	<0,17	<0,17	-	-	+	+
	Polipropileno	<0,17	<0,17	-	-	+	+
	Látex	<0,17	<0,17	-	-	-	-
	Silicone	2	<0,17	-	-	-	+
	Hypalon	<0,17	<0,17	-	-	+	+
	Vidro	<0,17	<0,17	-	-	+	+
	Nylon	>8	<0,17	-	-	+	+
	Saco de alumínio	3	2	-	-	+	+

Nota:

a) <0,17 min: equivale a aproximadamente 10 segundos, sendo o tempo necessário para a retirada do microrganismo veiculado ao suporte e sua transferência para o tubo de ensaio contendo o meio de cultura TSB.

b) A sigla CP significa "Controle Positivo". O símbolo "+" corresponde ao resultado positivo, isto é, quando se observa crescimento microbiano após sete dias de incubação.

c) A sigla CN significa "Controle Negativo". O símbolo "-" corresponde ao resultado negativo, isto é, não se observa crescimento microbiano após sete dias de incubação.

d) A utilização de materiais que contenham nylon deve ser evitada, pois durante a realização do experimento observou-se a degradação deste material na presença de peróxido de hidrogênio. Deve-se substituir todos os materiais desta constituição por outros já testados e certificados para a utilização no interior dos isoladores que receberão tratamento com peróxido de hidrogênio. O mesmo se aplica para materiais que contenham Látex, pois este material demonstrou que absorve peróxido, podendo comprometer a distribuição deste agente (o próprio controle positivo não apresentou resultados satisfatórios).

Tabela 11: Letalidade do *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^2 UFC/0,01mL veiculado em suporte de silicone após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio. (Corrida 3)

	Tempo em minutos necessário para eliminação do *B. stearothermophilus*		**Controle negativo**		**Controle positivo**	
Réplicas	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Silicone	2	<0,17	-	-	+	+

Nota:

a) <0,17* min: equivale a aproximadamente 10 segundos, sendo o tempo necessário para a retirada do microrganismo veiculado ao suporte e sua transferência para o tubo de ensaio contendo o meio de cultura TSB.

b) A sigla CP significa "Controle Positivo". O símbolo "+" corresponde ao resultado positivo, isto é, quando se observa crescimento microbiano após sete dias de incubação.

c) A sigla CN significa "Controle Negativo". O símbolo "-" corresponde ao resultado negativo, isto é, não se observa crescimento microbiano após sete dias de incubação.

Tabela 12: Compilação do Valor D dos diversos materiais presentes no interior dos isoladores inoculados com *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^6 UFC/0,01mL (Corridas 1) e 10^2 UFC/0,01mL (Corridas 2 e 3)

Material em Teste	**Valor D Experimental Corrida 1**	**Valor D Experimental Corrida 2**	**Valor D Experimental Corrida 3**
PVC	>1,28	0,06	-
Aço Inoxidável	>1,28	0,06	-
CKC	>1,28	0,06	-
Teflon	>1,28	0,06	-
Polipropileno	>1,28	0,06	-
Látex	>1,28	0,06	-
Silicone	>1,28	0,69	0,10
Hypalon	>1,28	0,06	-
Vidro	>1,28	0,06	-
Nylon	>1,28	>2,75	-
Saco de alumínio	>1,28	0,06	-

O material mais indicado a ser utilizado como suporte para tratamento com peróxido de hidrogênio é o aço inoxidável, por ser tratar de material inerte e por ser o principal constituinte dos isoladores. Materiais celulósicos devem ser evitados uma vez que há um potencial risco de absorção do agente esterilizante, o que pode levar a obtenção de resultados não fidedignos.

A utilização de outros tipos de materiais para suporte é viável, como demonstrado neste experimento. Porém, devido a facilidade da obtenção de suportes de aço inoxidável e seu fácil tratamento, por se tratar de um material termo resistente, é o preferencial para esta finalidade.

5.3 Determinação do microrganismo mais resistente a ser utilizado como indicador biológico

a) Concentração de VHP durante o ciclo

Tabela 13: Concentração de VHP observada durante a execução do teste de letalidade do *Bacillus stearothermophilus* na concentração de 10^6 UFC/0,01mL veiculados em suportes de diversas naturezas presentes no interior de isoladores após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio (Corrida 4)

Tempo (horas após início Fase Esterilização)	**Concentração de VHP medido pelo Draeger Polytron (ppm)**
0	30
1	1460
2	1680
3	1710
4	1690
5	1610

b) Contagem de células da suspensão utilizada nos experimentos

Microrganismo	UFC/0,01mL
Bacillus sp	$1,86 \times 10^2$
Micrococcus luteus	$1,71 \times 10^2$
Corynebacterium	$9,1 \times 10^1$
Staphylococcus sp	$1,1 \times 10^2$
Penicillium	$1,76 \times 10^2$
Bacillus stearothermophilus	$1,5 \times 10^2$

c) Determinação do Valor D dos microrganismos da flora e *Bacillus stearothermophilus*

Valor D experimental "T"/("L" – LOG lnN/q)

a) *Bacillus sp*

Tempo "T": <0,17

"L":log $1,86 \times 10^3 = 3,27$

Valor D experimental: 0,17/(3,27– LOG ln2/0) = 0,17/(3,27 – (-0,16)) = 0,17 / 3,43= 0,05

b) *Staphylococcus sp*

Tempo "T": <0,17

"L":log 1,10 x 10^3 = 3,05

Valor D experimental: 0,17/(3,05– LOG ln2/0) = 0,17/(3,05 – (-0,16)) = 0,17 / 3,21= 0,05

c) *Micrococcus sp*

Tempo "T": <0,17

"L":log 1,71 x 10^3 = 3,23

Valor D experimental: 0,17/(3,23– LOG ln2/0) = 0,17/(3,23 – (-0,16)) = 0,17 / 3,21= 0,05

d) *Corynebacterium sp*

Tempo "T": <0,17

"L":log 9,1 x 10^2 = 1,95

Valor D experimental: 0,17/(1,95– LOG ln2/0) = 0,17/(1,95 – (-0,16)) = 0,17 / 2,11= 0,08

e) *Penicillium sp*

Tempo "T": <0,17

"L":log 1,76 x 10^3 = 3,25

Valor D experimental: 0,17/(3,25– LOG ln2/0) = 0,17/(3,25 – (-0,16)) = 0,17 / 3,41= 0,05

f) *Bacillus stearothermophilus*

Tempo "T": 10

"L":log 1,50 x 10^3 = 3,18

Valor D experimental: 10/(3,18– LOG ln2/0) = 10/(3,18 – (-0,16)) = 10 / 3,34= 2,99

Tabela 14: Letalidade dos diversos microrganismos presentes na microbiota da área produtiva e *Bacillus stearothermophilus* veiculados em suportes de aço inoxidável após a exposição a tempos crescentes de peróxido de hidrogênio (Corrida 4)

	Tempo em minutos necessário para eliminação do microrganismo teste		**Controle negativo**		**Controle positivo**	
Réplicas	**1**	**2**	**1**	**2**	**1**	**2**
Bacillus sp	<0,17	<0,17	-	-	+	+
M. luteus	<0,17	<0,17	-	-	+	+
Corynebacterium	<0,17	<0,17	-	-	+	+
Staphylococcus sp	<0,17	<0,17	-	-	+	+
Penicillium sp	<0,17	<0,17	-	-	+	+
B. stearothermophilus	10	10	-	-	+	+

Tabela 15: Comparação Valor D microbiota e *Bacillus stearothermophilus*

Microrganismo teste	**Valor D experimental**
Bacillus sp	0,05
M. luteus	0,05
Corynebacterium	0,08
Staphylococcus sp	0,05
Penicillium sp	0,05
B. stearothermophilus	2,99

Os resultados obtidos nesta fase do experimento comprovam que o microrganismo *Bacillus stearothermophilus* é o mais resistente quando da ação do peróxido de hidrogênio e portanto o mais indicado para ser utilizado como monitor biológico. Tal fato foi também comprovado pela Steris® Corporation, fabricante do equipamento de Gerador de Gás de Peróxido de Hidrogênio (Gerador de VHP), que realizou o desafio com uma gama de microrganismos listados no anexo C.

6. CONCLUSÃO

- O suporte mais adequado para a veiculação de microrganismos desafiadores é o constituído pelo aço inoxidável.

- O microrganismo mais resistente frente a ação do peróxido de hidrogênio é *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 quando comparado aos micorganismos da microbiota da área produtiva.

- A utilização de materiais que contenham nylon deve ser evitada, pois durante a realização do experimento observou-se a degradação deste material na presença de peróxido de hidrogênio. Deve-se substituir todos os materiais desta constituição por outros já testados e certificados para a utilização no interior dos isoladores que receberão tratamento com peróxido de hidrogênio. O mesmo se aplica para materiais que contenham Látex, pois este material demonstrou que absorve peróxido, podendo comprometer a distribuição deste agente.

- A utilização de monitor biológico constituído por *Bacillus stearothermophilus* como microrganismo desafiante veiculados em suporte de aço inoxidável adquirido de instituições terceirizadas é cientificamente justificada.

REFERÊNCIAS

1. AGALLOCO, J. Barriers, isolators and microbial control, **J. Parenter. Sci. Technol.**, Philadelphia, v.53, n.1, p.48-53, 1999.
2. AGALLOCO, J. Opportunities and Obstacles in the Implementation of Barrier Technology, **PDA Journal of Pharmaceutical Sciences and Technology**, vol 49, n°5, p. 244-248, September-October 1995.
3. AGALLOCO, J. Qualification and validation of environmental systems. **J. Parenter Sci. Technol.**, Philadelphia, v.50, n.5, p.280-289, 1996.
4. AGALLOCO, J. Steam sterilization-in-place technology. **J. Parenter. Sci. Technol.**, Philadelphia, v.44, n.5, p.253-256, 1990.
5. 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.
6. ASEPTIC processing and terminal sterilization. **J. Parenter. Sci. Technol.**, Philadelphia, v.45, n.6, p.254-258, 1991.
7. COLES, T. Conceptual Design of Isolators for Handling and Processing Dry Bulk Pharmaceutical Chemicals, **Pharmaceutical Engineering**, p.60-78 March/April 1998.
8. COLES, T. Experience in the Design and Use of Isolator Systems for Sterility Testing, **PDA Journal f Pharmaceutical Science and Technology**, vol. 49, n°3, p. 140-144, May/June 1995.

9. COLES, T. **Isolator Technology**, a Practical guide. p.269

10. DENYER, S.P., BAYRD, R.M. **Guide to microbial control in pharmaceuticals**. 1° ed., Chinchester: Ellis Horwoood, 1990. 389p.

11. DREAM, R. F. **Containment Practices in the Pharmaceutical Industries**, Pharmaceutical Engineering, p. 90-100, March/April 1998

12. FAVIER, M. Preparing cytotoxic agents in an isolator , **American Journal Hospital Pharm**, Vol 50, p.2335-2339, November 1993.

13. FOOD and Drug Administration Guideline on sterile drug products produced by aseptic processing, Rockville, **FDA** 1987, 43p.

14. FORCINO, H. **The Challenge of Barrier Technology for Aseptic Filling**, p. 4-7

15. FORCINO,H. Isolator Technology, Simplifies (and Complicates) Aseptic Filling of Pharmaceuticals – **Life Sciences Quality Control**, p. 27-32, July/August 1998

16. FRANCIS, L. The History and Principles of Barrier Technology for the Pharmaceutical and Biotech Industries, **Pharmaceutical Engineering**, March/April, p.38-47

17. FRIEDMAN, R. L. – Design of Barrier Isolators for Aseptic Processing: a GMP Perspective, **Pharmaceutical Engineering**, p. 28-360, March/April 1998

18. FUNDAMENTALS of a microbiological environmental monitoring program, **J. Parenter. Sci. Technol.**, Philadelphia, vol.44, supl.1990, 16p.

19. GARRY, V.V. **Ethylene oxide:evidence of Human Chromosomal effects. Environ. Mut**. 1:375-382,1979.

20. HASTRUP, B. Use of biological monitors for validation and cycle control in ethylene oxide sterilization. In: Workshop on biological monitoring of sterilization. **London: Eucomed**, 1986.p.57-71

21. HUGO, W.B., RUSSEL,A.D. Pharmaceutical Microbiology. 3° ed., Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, 1983,. 470p.

22. INOUE, T. **National Institute of Health Sciences**, Comparison of Resitance Among Different Brands of Commercially Prepared BIs by Vapor Phase Hydrogen Peroxide Sterilization

23. INSTITUTE of Environmental Sciences and Technology, **IEST-RPCC-0062**: testing clean rooms, Mount Prospect: IES, 1992. 35p.

24. 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.

25. LYDA, J.C. Regulatory Aspects of Isolation/Barrier Technology, **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, Vol. 49, n° 6, p.300-304, November-December 1995

26. **MEDICE Agency Control**, Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products, 1997

27. MELGARD, H. L. Barrier Technologies Design Issues, **Pharmaceutical Engineering**, November/December, p. 24-32, 1994

28. MELLY, E., COWAN,A.E. AND SETLOW,P. Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. **J. of Applied Microbiology**, v.93, p.316-325, 2002.

29. OLIVEIRA, D.C. – **Esterilização por Óxido de Etileno: Estudo da Efetividade Esterilizante de Misturas não Explosivas e Compatíveis com a Camada de Ozônio**. São Paulo 2000, 159p. (Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).

30. OVERVIEW of Microbiological and Compendial Concepts of Pharmaceutical Sterility Testing – **Training Course Lilly**

31. 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.

32. 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.

33. PDA presentation at FDA open conference on sterile drug manufacturing. **J. Parenter. Sci. Technol.**, Philadelphia, v.48, n. 8, p.4-6, 1994.

34. PDA. The Design and Monitoring of Isolators – A Specification for Pharmaceutical Applications, **Regional Meeting Quality Control Sub-Comittee of Regional Pharmaceutical Officers**, edition 1, September 1993

35. Pelliizzi, R.J. Federal Standard 209E: plan for change. **Med. Device Diag. Ind.**, Santa Monica, v.15, n°2, p 40-42, 77-78, 1993.

36. **PIC/PICS** "Draft Recommendations on the Inspecion of Isolator Technology", PS/W/3/97 (rev. 2), January 1998

37. RUSSEL, A.D., HUGO, W.B.AYLIFFE, G.A.J. Principls and practice of disinfectation, preservation and sterilization. 1ed. **Oxford: Blackwell Scientific Publications**, 1982, 653p.

38. RUTALA 3°, J.M., LUO, M., CICERONE, R.J., DEAVER, L.E. Satellite confirmation of the dominance of chlorofluorocarbons in the global stratospheric chlorine budget. **Nature**, London, v.379, n.6565, p.526-52, 1996

39. SIRCH, 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.

40. SHIPLEY, D. Minienvironments, Gloveboxes and Biological Safety Cabinets: Defining the Terms, **Life Sciences Isolation Technology**, p.21-24, April 1998.

41. STUMBO,C.R. Thermobacteriology in food Processing, 2nd edition. **New York: Academic Press**, 1973.

42. **USP 27** <71> Sterility Testing/ Microbiological Tests p.1822, 2004

43. **USP 27**, Chapter <1116> Microbiological Evaluation /*General Information,* p. 2104-2105, 2004

44. VALIDATION Manual. VHP™ 1000 Biodecontamination System, **AMSCO**

45. WALLHÄUSSER, K.H. sterilization. In: REHM, H.J., REED, G. **Biotechnology. Weinheim**, 1985. p701-23

46. WAGNER, C. **Introduction to Isolator Technology – Current Challenges**

47. WAGNER, C. Industry Survey on Sterility Testing Isolators: Current Status and Trends, **Pharmaceutical Engineering**, p. 134-148, March/April 2001

48. 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.

ANEXOS

ANEXO A: MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS PELO EQUIPAMENTO VITEK® BIOMERIÉUX

Os microrganismos obtidos durante a amostragem de superfícies e ar ativo e passivo foram submetidos a identificação empregando o equipamento BioMeriéux Vitek®, que possui um sistema automatizado para fungos e bactérias. Utilizam-se unidades de leitura denominadas cartões, que permitirão comparações bioquímicas codificadas e variações colorimétricas e de turbidez.

Material utilizado para a identificação:

- solução fisiológica 0,45% estéril
- tubos de vidro 11x12 mm estéreis
- ponteiras estéreis
- pipeta automática regulável
- água oxigenada (catalase)
- fita para 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/Haemophillus

- ANI – identificação de anaeróbios
- YBC – identificação de leveduras
- Controles positivos de fungos e bactérias ATCC (*American Type Culture Collection*)

Método

Ajuste do colorímetro

- Colocar um tubo com solução salina 0,085% dentro do colorímetro
- Certificar-se que o encaixe está de acordo
- A leitura deve marcar 100% de transmitância. Ajustar utilizando o botão da direita.
- Retirar o tubo e proceder ao bloqueio da luz
- Pressionar o botão central do aparelho, a leitura deve marcar 10% de transmitância. Utilizar o botão da esquerda para ajuste.

Preparo dos cartões

Identificação dos cartões

O cartão é identificado por 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.

Oxidase (+) – preencher o círculo

Oxidase (-) – não preencher o círculo

b) Cocos Gram negativos

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

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

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

No caso de microrganismos catalase positiva (+), preencher o resultado da coagulase no espaço 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 microrganismos 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.

<u>Inoculação dos cartões</u>

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 inóculo.

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 pressionar 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 nenhuma bolha permaneceu nos orifícios do cartão. Se isto 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 1,8 mL 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 água oxigenada para verificar se a bactéria produz o não catalase.

f. Colocar os cartões m 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 1,8 mL de solução fisiológica.

c. Verificar a turvação no colorímetro. A leitura do inóculo deve estar o VERDE.

d. Proceder conforme descrito acima (de c até k item GNI/GPI).

e. Incubar por 24 horas e 40 horas, 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 ser 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 depois de preenchidos encima 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:

Tabela 16 - Interpretação do cartão NHI do Vitek®

Teste	Código do Teste	Reação Positiva	Reação Negativa	Comentários
1	ALA	Amarelo	Amarelo bem pálido ou claro	Cores amarelo fracas ou pálidas são negativas. Somente amarelos bem definidos são considerados negativos. Se houver dúvida deixar uma (?) no lugar.
2	OPS			
3	PRO			
4	GGT			
5	GLY			
6	LYS			
7	ONPG			
8	PHN			

Teste	Código do Teste	Reação Positiva	Reação Negativa	Comentários
9	GLU	Amarelo ou laranja claro	Vermelho ou laranja escuro	Somente considerar como positivo os resultados amarelos ou laranja claro;outras

				cores considerar duvidoso (?)
	SUC			
10				
	MLT			
11				
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 os testes 1 e 2 forem positivos e houve 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 significante 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 emitir um relatório alertando que o cartão deve ser incubado por mais 24 horas.

c) Após este período de incubação, retirar da estufa, preencher o círculo do canto superior direito do cartão (indica leitura com 48 horas) 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, pressionar 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 selecionar 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 ao 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 qual horário.

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

dir b – mostra todos os cartões que estão na bandeja b, em que posição está e quanto tempo tem 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 um 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 está o cartão.

Nota: as correções dos números 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/Haemophillus.

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

Teste n°: colocar 1 [ENTER]

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

N° da cepa: colocar o número do dígito

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

Microrganismo: colocar a sigla correspondente ao microrganismo.

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 microrganismos. 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 irá perguntar se o usuário deseja imprimir a lista de todos os cartões contidos nesta seção.
c) Digitar "y" quando a lista for grande, o que irá permitir visualizar os resultados de todos os cartões com problemas.
d) Colocar o número dos cartões nos quais é necessário se fazer a opção.
e) Digitar "s"
f) Escolher o item que corresponde ao microrganismo correto.

ANEXO B: IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS POR MÉTODO MICROSCÓPICO

A identificação de fungos é manual e inclui as etapas descritas abaixo:

a) Com o auxílio de uma agulha de platina, amostrar uma porção do fungo a ser submetido a identificação

b) Colocar a amostra em uma lâmina de vidro. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, gotejar o corante azul de lactofenol sobre a amostra e cobrir com uma lamínula.

c) Observar em microscópio (aumento de 400 vezes).

d) Comparar as características macroscópocas e microscópicas com a literatura correspondente.

ANEXO C: MICRORGANISMOS TESTADOS CONTRA O PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO PELA STERIS® CORPORATION

	Microrganismo	ATCC
Bactérias	*Staphylococcus aureus*	
	Streptococcus faecalis	6559
	Streptococcus sp.	
	Pseudomonas aeroginosa	15442
	Pseudomonas cepacia	
	Mycobacterium sp.	
	Lactobacillus casei	4646
	Mycobacterium smegmati	
	Serratia marcescens	14041
	Escherichia coli	
	Proteus vulgaris	

	Microrganismo	ATCC
Esporos de Fungos/Leveduras	*Aspergillus niger*	16404
	Aspergillus sp.	
	Aspergillus terreus	
	Norcadia sp.	
	Fusarium sp.	
	Candida parapsilosis	7330
	Candida sp.	
	Rhodotorula sp.	
	Saccharomyces sp.	
Esporos de Bactérias	*Bacillus pumilus*	27142
	Bacillus stearothermophilus	12980
	Bacillus subtilis	9372
	Bacillus cereus	
	Clostridium sporogenes	3584
	Clostridium botulinum	
Vírus	Adenovirus 2	
	Herpes Simplex Type I	
	Influenza A2I	
	Polio Type I	
	Rhinovirus 14	

RESUMO

A resistência de cinco microrganismos presentes na microbiota da área de produção estéril (Cristalização Estéril), frente a ação do gás de peróxido de hidrogênio foi determinada e o valor D obtido para cada microrganismo foi comparado ao valor D do *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 exposto ao mesmo agente. Os microrganismos testados foram *Bacillus sp, M. luteus, Corynebacterium, Staphylococcus sp e Penicillium sp.* Este teste tinha a finalidade de comprovar que a resistência do *Bacillus stearothermophilus* é maior quando da exposição ao peróxido de hidrogênio se comparada a outros microrganismos presentes na área produtiva. A metodologia consistiu da inoculação de 0,01 mL da suspensão de cada microrganismo na contagem de 10^2UFC/0,01mL em cupons de aço inoxidável, previamente esterilizados por calor seco e posterior exposição ao gás de peróxido de hidrogênio. O experimentou demonstrou que o valor D obtido para o *Bacillus stearothermophilus* é superior aos obtidos para os outros microrganismos em teste comprovando que a escolha deste microrganismo para o desafio contra o peróxido de hidrogênio é apropriada. Também executou-se o teste que visava garantir que o aço inoxidável é o material de suporte mais recomendado para este fim, utilizando-se suportes de diversos materiais normalmente encontrados no interior dos isoladores (PVC, aço inoxidável, CKC, teflon, polipropileno, látex, silicone, Hypalon, vidro, nylon, saco de alumínio) com 0,01 mL de inóculo de *Bacillus stearothermophilus* na contagem de 10^2UFC/0,01mL, o que foi devidamente comprovado.

ABSTRACT

The resistance of five microrganisms found in the sterile production area (Crystallization Area) flora was tested against the hydrogen peroxide gas and the D value of each microrganism was compared to the *Bacillus stearothermophilus* D Value ATCC 12980 exposed to the same agent. The microrganisms tested were *Bacillus sp, M. luteus, Corynebacterium, Staphylococcus sp e Penicillium sp.* The purpose of this test was to prove that the resistance of *Bacillus stearothermophilus* against the exposition the hydrogen peroxide is higher when compared to others microrganisms found in the production area. The methodology consisted in inoculating 0.01mL of microrganisms suspension with 10^2UFC/0,01mL count in stainless steel coupons, treated previously with dry heat and further exposition to the hydrogen peroxide. The experiment demonstrated that the *Bacillus stearothermophilus* D value is higher against all others microrganisms tested proving that the use of this microrganism for the challenge is appropriate. It was also performed a test to guarantee that the stainless steel support is the most recommended one for this purpose, using supports of different materials normally found in the interior of the isolators (PVC, stainless steel, CKC, Teflon, polypropylene, latex, silicon, Hypalon, glass, nylon, aluminum foil) with 0,01 mL *Bacillus stearothermophilus* inoculum with the count of 10^2UFC/0,01mL, that was properly verified.