UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Métodos rápidos para identificação microbiana aplicados ao
monitoramento ambiental de salas limpas: ênfase na
tecnologia MALDI-TOF**

Laíse de Oliveira Andrade

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientadora:
Profa Dra Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Métodos rápidos para identificação microbiana aplicados ao
monitoramento ambiental de salas limpas: ênfase na
tecnologia MALDI-TOF**

Laíse de Oliveira Andrade

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientadora:
Profa Dra Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

A553m Andrade, Laíse de Oliveira
 Métodos rápidos para identificação microbiana
 aplicados ao monitoramento ambiental de salas
 limpas: ênfase na tecnologia MALDI-TOF / Laíse de
 Oliveira Andrade. - São Paulo, 2017.
 143 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Microbiologia farmacêutica. I. T. II. Pinto,
Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

Laíse de Oliveira Andrade

**Métodos rápidos para identificação microbiana aplicados ao
monitoramento ambiental de salas limpas: ênfase na
tecnologia MALDI-TOF**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa Dra Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientadora/ Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017.

À minha pequena e amada filha Lorena, que, ainda no meu ventre, trouxe um novo colorido para a minha vida e foi minha companheira na finalização deste trabalho, me dando forças para concluir essa jornada de estudos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, pela direção, pelas oportunidades, pelo crescimento pessoal durante esse período de estudo e pelo amparo nos momentos difíceis.

À Profa. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, pela oportunidade, compreensão, apoio, incentivo e por transmitir suas experiências enriquecedoras de vida tanto no âmbito profissional quanto no pessoal.

Aos professores e ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de crescimento e aprimoramento.

À Daniela Dal Molim Ghisleni e à Marina de Souza Braga pela atenção, disponibilidade e auxílios prestados durante a execução deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas – Confar por toda a ajuda, aprendizado, companheirismo e amizade.

À meus pais Nestor e Kilza, pelo amor e apoio incondicionais e pela orientação de vida.

À meu marido Caique, pela compreensão e paciência.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela colaboração e simpatia.

À todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

ANDRADE, L. O. **Métodos rápidos para identificação microbiana aplicados ao monitoramento ambiental de salas limpas: ênfase na tecnologia MALDI-TOF**. 2017. 143f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF (do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight*) (MALDI-TOF MS) tem sido cada vez mais incorporada à rotina de identificações microbiológicas nos laboratórios farmacêuticos de controle de qualidade, principalmente para as atividades do Programa de Monitoramento Ambiental de Salas Limpas. Isso porque o longo tempo necessário para a obtenção dos resultados por meio de métodos convencionais tem incentivado a procura por técnicas que permitam métodos rápidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a adequação da técnica MALDI-TOF MS para a identificação de bactérias isoladas do ambiente de salas limpas utilizadas em algumas etapas da produção de uma vacina viral. Treze espécies bacterianas conhecidas, normalmente isoladas das salas limpas estudadas, e cinco cepas ATCC foram identificadas pela técnica MALDI-TOF MS e por uma técnica bioquímica (BBL Crystal®). O desempenho da técnica MALDI-TOF MS foi superior ao da técnica bioquímica na identificação correta das espécies bacterianas (88,89% e 38,89%, respectivamente) e produziu menos identificações não confiáveis (5,55% e 22,22%, respectivamente). Os resultados evidenciaram que a técnica MALDI-TOF MS pode ser implementada para identificação rotineira de bactérias em um laboratório de controle de qualidade farmacêutico. Entretanto, a dependência de bases de dados exige estudos adicionais de isolados não identificados e, se apropriado, a adição destes a uma base de dados interna. O aperfeiçoamento de métodos de identificação microbiana é muito relevante no contexto de salas limpas, pois permitem ações corretivas e proativas essenciais para garantir a segurança microbiológica do processamento asséptico.

Palavras-chave: Espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF. Identificação bacteriana. Métodos microbiológicos rápidos. Monitoramento ambiental. Sala limpa.

ABSTRACT

ANDRADE, L. O. **Rapid methods for microbial identification applied to clean room environmental monitoring: emphasis on MALDI-TOF technology**. 2017. 143f. Dissertation (Master degree) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been increasingly introduced in routine microbiological identifications of pharmaceutical quality control laboratories, mainly for the activities of the Environmental Monitoring Program of Clean Rooms. The long time needed to obtain the results through conventional methods has stimulated the search for techniques that allow rapid methods, as MALDI-TOF MS. Thus, the objective of this work was to evaluate the suitability of the MALDI-TOF MS technique for the identification of bacteria isolated from the environment of clean rooms used in some stages of the production of a viral vaccine. Thirteen bacterial species commonly isolated from clean rooms studied and five strains ATCC were identified by MALDI-TOF MS technique and by a biochemical technique (BBL Crystal® System). Performance of MALDI-TOF MS was better than biochemical technique for correct species identifications (88.89% and 38.89%, respectively) and produced fewer unreliable identifications (5.55% and 22.22%, respectively). MALDI-TOF MS can be implemented for routine identification of bacteria in a pharmaceutical quality control laboratory. However, as a database-dependent system, maybe some isolated not identified by this technique must be additionally studied and, if appropriate, added to an in-house database.

Keywords: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Bacterial identification. Rapid microbiological methods. Environmental monitoring. Pharmaceutical clean room.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Classes de limpeza do ar para partículas em suspensão, selecionadas para salas e zonas limpas.....	36
Quadro 2 -	Sistema de classificação do ar para a produção de produtos estéreis, conforme a RDC nº 17/ 2010.....	37
Quadro 3 -	Comparação entre os diferentes sistemas de classificação para áreas limpas, em repouso.....	38
Quadro 4 -	Limites para contaminação microbiana em unidades formadoras de colônias (UFC).....	39
Quadro 5 -	Frequência de monitoramento de partículas viáveis do ar e de superfícies nas salas limpas.....	79
Quadro 6 -	Frequência de monitoramento de partículas viáveis nos operadores.....	80
Quadro 7 -	Limites de contaminação microbiana conforme a classificação da área limpa e a técnica de amostragem.....	81
Quadro 8 -	Atividades realizadas nas salas limpas com contagens nos limites estabelecidos e acima da especificação.....	91
Quadro 9 -	Espécies bacterianas encontradas com maior frequência nas áreas limpas durante a Campanha 1.....	95
Quadro 10 -	Espécies bacterianas encontradas com maior frequência nas áreas limpas durante a Campanha 2.....	96
Quadro 11 -	Espécies bacterianas encontradas em luvas e roupas de operadores das áreas limpas durante a Campanha 1.....	97
Quadro 12 -	Espécies bacterianas encontradas em luvas e roupas de operadores das áreas limpas durante a Campanha 2.....	97
Quadro 13 -	Plano de amostragem da sala limpa 1.....	124

Quadro 14 -	Plano de amostragem da sala limpa 2.....	125
Quadro 15 -	Plano de amostragem da sala limpa 3.....	126
Quadro 16 -	Plano de amostragem da sala limpa 4.....	127
Quadro 17 -	Plano de amostragem da sala limpa 5.....	128
Quadro 18 -	Plano de amostragem da sala limpa 6.....	129
Quadro 19 -	Plano de amostragem da sala limpa 7.....	130
Quadro 20 -	Plano de amostragem da sala limpa 8.....	131
Quadro 21 -	Plano de amostragem da sala limpa 9.....	132
Quadro 22 -	Plano de amostragem da sala limpa 10.....	133
Quadro 23 -	Plano de amostragem da sala limpa 11.....	134
Quadro 24 -	Plano de amostragem da sala limpa 12.....	136
Quadro 25 -	Plano de amostragem da sala limpa 13.....	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Critérios para classificação das áreas limpas.....	38
Figura 2 -	Representação esquemática do amostrador de ar do tipo <i>Slit-to-Agar</i>	42
Figura 3 -	Amostrador de ar do tipo <i>Slit to Agar</i> vendido comercialmente.....	43
Figura 4 -	Amostrador de ar do tipo <i>Sieve Impactor</i> vendido comercialmente.....	43
Figura 5 -	Amostrador de ar do tipo <i>Centrifugal Air Sampler</i> e tira de base plástica flexível contendo meio ágar nutriente vendidos comercialmente.....	44
Figura 6 -	Representação esquemática da peça que contém a hélice do amostrador de ar do tipo <i>Centrifugal Air Sampler</i>	44
Figura 7 -	Representação esquemática do amostrador de ar do tipo <i>Sterilizable Microbiological Atrium</i>	45
Figura 8 -	Amostrador de ar do tipo <i>Sterilizable Microbiological Atrium</i> vendido comercialmente.....	45
Figura 9 -	Galerias API®. Substratos sendo reconstituídos com suspensão de células microbianas.....	52
Figura 10 -	Leitura dos resultados em uma galeria API®.....	52
Figura 11 -	Constituintes do sistema comercial para identificação microbiana BBL Crystal®.....	53
Figura 12 -	Equipamento e estação de trabalho do Vitek®2.....	54
Figura 13 -	Cartões de identificação do Vitek®2.....	54
Figura 14 -	Fluxo da análise de identificação pelo Vitek®2.....	55

Figura 15 -	Sistema automatizado de identificação bioquímica OmniLog® ID (Biolog, Hayward, USA). A: Incubadora e leitora OmniLog e computador com base de dados. B: Interior da incubadora e leitora OmniLog.....	56
Figura 16 -	Microplaca contendo 71 fontes de carbono (açúcares, ácidos carboxílicos, aminoácidos e peptídeos) e 23 ensaios de sensibilidade química (tolerância aos pHs 7, 6 e 5; tolerância às concentrações de cloreto de sódio de 1%, 4% e 8%; tolerância ao ácido láctico; poder de redução; coloração de Gram).....	57
Figura 17 -	Princípio do teste ELISA no formato “sanduíche”.....	58
Figura 18 -	Sistema automatizado de identificação microbiana por imunoensaio VIDAS® (bioMerieux, Hazelwood, Mo., U.S.A.).....	59
Figura 19 -	Fluxo de análise pelo sistema VIDAS® (bioMerieux, Hazelwood, Mo., U.S.A.).....	59
Figura 20 -	Conceito do sistema VIDAS®: tubo recoberto internamente com anticorpos e tira reagente contendo a quantidade necessária de cada reagente para o teste.....	59
Figura 21 -	A – Parede celular de uma bactéria Gram positiva; B – Parede celular de uma bactéria Gram negativa.....	60
Figura 22 -	Sistema de identificação microbiana rápida Sherlock® (MIDI).....	61
Figura 23 -	Espectro no infravermelho por transformada de Fourier de endosporos de três espécies do gênero <i>Bacillus</i> : <i>B. thuringiensis</i> israelensis, <i>B. cereus</i> e <i>B. megaterium</i>	62
Figura 24 -	Processo de preparo de amostra para análise por FTIR.....	63
Figura 25 -	Analizador de massas TOF.....	66
Figura 26 -	Esquema geral de identificação de microrganismos inteiros por MALDI-TOF MS.....	67

Figura 27 -	Ionização de analitos por MALDI. O cocrystal de matriz e amostra é atingido pelo laser, causando dessorção seguida de desolvatação e então introdução no analisador de massas.....	67
Figura 28 -	Sistema de identificação microbiana por espectrometria de massas Vitek® MS (bioMérieux, Hazelwood, Mo., USA).....	69
Figura 29 -	Fluxo de produção dos monovalentes da vacina viral.....	77
Figura 30 -	Fluxograma do Programa de Monitoramento Ambiental com vistas a identificação microbiana.....	79
Figura 31 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 1.....	124
Figura 32 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 2.....	125
Figura 33 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 3.....	126
Figura 34 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 4.....	127
Figura 35 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 5.....	128
Figura 36 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 6.....	129
Figura 37 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 7.....	130
Figura 38 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 8.....	131
Figura 39 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 9.....	132
Figura 40 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 10.....	133
Figura 41 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 11.....	135
Figura 42 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 12.....	136
Figura 43 -	Esboço da planta baixa da sala limpa 13.....	137

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Frequência de amostragem das partículas viáveis no período considerado.....	88
Gráfico 2 -	Frequência de resultados do monitoramento ambiental nos limites estabelecidos e acima da especificação durante a Campanha 1.....	89
Gráfico 3 -	Frequência de resultados do monitoramento ambiental nos limites estabelecidos e acima da especificação durante a Campanha 2.....	89
Gráfico 4 -	Distribuição das contagens nos limites estabelecidos e acima da especificação conforme as salas limpas em que foram observadas durante a Campanha 1.....	90
Gráfico 5 -	Distribuição das contagens nos limites estabelecidos e acima da especificação conforme as salas limpas em que foram observadas durante a Campanha 2.....	92
Gráfico 6 -	Frequência com que contagens nos limites estabelecidos ou acima da especificação foram recuperados pelo método de amostragem ativa, conforme os graus de classificação dos pontos de amostragem, nas duas campanhas.....	92
Gráfico 7 -	Frequência com que contagens nos limites estabelecidos ou acima da especificação foram recuperados pelo método de amostragem passiva, conforme os graus de classificação dos pontos de amostragem, nas duas campanhas.....	93
Gráfico 8 -	Frequência com que contagens nos limites estabelecidos ou acima da especificação foram recuperados pelos métodos de amostragem de superfície, conforme os graus de classificação dos pontos de amostragem, nas duas campanhas.....	93
Gráfico 9 -	Frequência de monitoramento de partículas viáveis nos operadores durante as duas campanhas estudadas.....	94

Gráfico 10 -	Frequência de resultados do monitoramento dos operadores nos limites estabelecidos e acima da especificação durante a Campanha 1.....	94
Gráfico 11 -	Frequência de resultados do monitoramento dos operadores nos limites estabelecidos e acima da especificação durante a Campanha 2.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de produtos biofarmacêuticos e suas indicações terapêuticas.....	30
Tabela 2 - Bactérias selecionadas para o estudo.....	85
Tabela 3 - Resultados das identificações das bactérias selecionadas para o estudo pela técnica MALDI-TOF MS e pelo sistema BBL Crystal®.....	98
Tabela 4 - Resultados das análises feitas pelo método MALDI-TOF MS conforme o nível de identificação obtido nas triplicatas.....	100
Tabela 5 - Resultados das análises feitas pelo sistema BBL Crystal® conforme o nível de identificação obtido nas triplicatas.....	102
Tabela 6 - Concordância entre as identificações pela técnica MALDI-TOF MS e pelo sistema BBL Crystal® para as espécies bacterianas estudadas.....	103
Tabela 7 - Identificações por MALDI-TOF MS e pelo sistema BBL Crystal® comparadas às identificações finais.....	104
Tabela 8 - Medidas da exatidão a nível de gênero e espécie da técnica MALDI-TOF MS e do sistema BBL Crystal®.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CG	Cromatografia gasosa
CHCA	Alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
CP	Protocolo de Comparabilidade do FDA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	European Commission
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FB5	Farmacopeia Brasileira 5ª edição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
HVAC	<i>Heating, ventilation and air-conditioning</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IVB	Instituto Vital Brazil
JP17	<i>Japanese Pharmacopoeia 17th Edition</i>
M	Margem de não inferioridade

MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight</i>
N	Número correspondente ao grau de classificação de limpeza do ar em uma sala limpa, conforme a norma NBR ISO 14644 da ABNT
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PACMP	<i>Post approval change management protocol</i>
PASNI	Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos
PDA	<i>Parenteral Drug Association</i>
Ph. Eur.	<i>European Pharmacopoeia</i>
PMDA	<i>Pharmaceuticals and Medical Devices Agency</i>
PNI	Programa Nacional de Imunizações
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
TECPAR	Instituto de Tecnologia do Paraná
TGA	<i>Therapeutic Goods Administration</i>
TOF	<i>time-of-flight</i>
TR33	<i>PDA Technical Report nº 33 - Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1 Biotecnologia para a saúde humana: produção de vacinas	29
2.2 Boas práticas de fabricação na produção de imunobiológicos	34
2.2.1 Salas limpas	35
2.2.1.1 Programa de Monitoramento Ambiental	40
2.3 Métodos rápidos em microbiologia	47
2.3.1 Métodos rápidos para identificação microbiana	49
2.3.1.1 Ensaios bioquímicos	51
2.3.1.1.1 Sistemas miniaturizados	51
2.3.1.1.2 Sistemas automatizados	53
2.3.1.2 Métodos imunológicos	57
2.3.1.3 Perfis de ácido graxo	60
2.3.1.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	62
2.3.1.5 Espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF	64
2.3.2 Validação de métodos microbiológicos rápidos	69
2.3.3 Expectativas regulatórias	72
2.3.4 Parâmetros de validação para métodos alternativos de identificação microbiana	73
3. OBJETIVOS	75
3.1 Objetivo geral	75
3.2 Objetivos específicos	75
4. MATERIAL E MÉTODO	76
4.1 Material	76
4.2 Método	76
4.2.1 Amostragem e quantificação das partículas viáveis	79
4.2.1.1 Amostragem de ar para determinação de partículas viáveis	81
4.2.1.2 Amostragem de superfícies, luvas e roupas	82
4.2.2 Identificação dos microrganismos isolados nas áreas limpas estudadas	83
4.2.3 Verificação do método microbiológico alternativo	84
4.2.3.1 Recuperação e identificação das bactérias ambientais e preparo das culturas estoque	85
4.2.3.2 Identificação bioquímica pelo Sistema BBL Crystal®	86

4.2.3.3 Identificação bacteriana por MALDI-TOF MS	87
5. RESULTADOS	88
5.1 Amostragem e quantificação das partículas viáveis	88
5.2 Identificação dos isolados ambientais	95
5.3 Verificação do método microbiológico alternativo	98
6. DISCUSSÃO	105
7. CONCLUSÕES	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
APÊNDICES	124
APÊNDICE A – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 1	124
APÊNDICE B – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 2	125
APÊNDICE C – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 3	126
APÊNDICE D – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 4	127
APÊNDICE E – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 5	128
APÊNDICE F – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 6	129
APÊNDICE G – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 7	130
APÊNDICE H – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 8	131
APÊNDICE I – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 9	132
APÊNDICE J – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 10	133
APÊNDICE K – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 11	134
APÊNDICE K – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 12	136
APÊNDICE L – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 13	137
ANEXOS	138
ANEXO A – Currículo Lattes	138
ANEXO B – Ficha do aluno	142

1. INTRODUÇÃO

Os produtos biológicos representam, atualmente, a maior fonte de inovação da indústria farmacêutica e têm desempenhado importante papel no tratamento de diversas enfermidades que até então não eram medicadas eficazmente com as terapias tradicionais (INTERFARMA, 2012; WHO, 2015). Oriundos do emprego da biotecnologia – conceitualmente, a união da biologia com a tecnologia – na produção industrial, os impactos positivos causados por esses produtos na área da saúde podem ser observados claramente nos campos da produção hormonal e das doenças infecciosas. A produção de insulina artificial por meio da tecnologia do DNA recombinante trouxe maior eficácia para o tratamento de *diabetes mellitus* enquanto as infecções microbianas puderam ser melhor combatidas com a diversidade de antibióticos proporcionada pelo melhoramento genético dos microrganismos utilizados na produção desses fármacos (LOPES; PESSOA; SANTOS; BARBOSA, 2012).

Muitos produtos biológicos são feitos a partir de uma variedade de fontes naturais, como o ser humano, os animais e os microrganismos. Da mesma forma que os medicamentos de origem química, alguns produtos biológicos tem a função de tratar doenças enquanto outros são utilizados para preveni-las ou diagnosticá-las. Inclusos nessa categoria de produtos estão, por exemplo, as vacinas, os soros hiperimunes, os hemoderivados, os anticorpos monoclonais, os alergênicos, os medicamentos contendo microrganismos vivos, atenuados ou mortos, os medicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal e os medicamentos obtidos por procedimentos biotecnológicos, ou seja, medicamentos que tiveram seus princípios ativos obtidos por meio do emprego industrial de microrganismos ou células modificadas geneticamente (FDA, 2016).

As vacinas, especificamente, são um grupo de imunobiológicos que, do ponto de vista da saúde pública, representam as formas historicamente mais eficazes de prevenir doenças (REIS et al., 2009). Dentre as infecções que podem ser prevenidas com o emprego de vacinas, pode-se tomar como exemplo a gripe, que é monitorada globalmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS). De acordo com a OMS (2015), a vacina é a forma mais efetiva

para prevenção da infecção e dos severos sintomas causados pelo vírus da Influenza. Esta entidade tem colaborado, por mais de 50 anos, com cientistas e órgãos regulatórios no desenvolvimento de uma abordagem unificada no que diz respeito a fabricação, testes e supervisão regulatória para o desenvolvimento, uso e distribuição de tais vacinas, dada a sua importância para a saúde pública (WHO, 2014).

No Brasil, desde a década de 70 são feitos esforços para a organização de estrutura e de ações de imunização com o intuito de garantir o acesso da população às vacinas, assim como a qualidade das mesmas, o fortalecimento da capacidade de produção e a autossuficiência dos laboratórios nacionais (DINIZ; FERREIRA; 2010). Recentemente, um dos principais produtores públicos brasileiros de imunobiológicos, o Instituto Butantan, por meio de sua parceria com o *National Institutes of Health* dos Estados Unidos, desenvolveu e produziu uma vacina viva atenuada contra os 4 sorotipos da dengue e tem se encarregado dos testes clínicos (PRECIOSO et al., 2015). Tendo em vista o investimento nacional em biotecnologia para a produção de vacinas, é de suma importância que pesquisas no país sejam desenvolvidas nesse âmbito.

Durante a produção de vacinas, considerando-se a condição de esterilidade que estes produtos requerem, orientações abrangentes e rígidas devem ser seguidas para que seja obtido um produto seguro. Dentre as exigências, as salas limpas figuram como um requisito essencial (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Segundo a resolução RDC nº17/2010, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos, para a liberação de produtos estéreis, além do atendimento a distintos aspectos analíticos do produto, há que se avaliar um conjunto de particularidades do processo, com ênfase ao monitoramento ambiental quando se considera a não aplicabilidade de esterilização terminal (BRASIL, 2010a).

As salas limpas são ambientes controlados que demandam um programa de monitoramento ambiental capaz de detectar um evento adverso nas condições microbiológicas a tempo de permitir ações corretivas efetivas. Este programa visa controlar os níveis de microrganismos e de partículas não viáveis dentro de limites específicos, além de monitorar a diversidade microbiana. O conhecimento da microbiota normal das salas limpas é importante para propiciar informações úteis na investigação de fontes de

contaminação, especialmente quando os limites de ação são excedidos. Além disso, a identificação microbiana se faz necessária para estabelecer quais microrganismos devem ser utilizados na validação e na avaliação da capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura destinados ao monitoramento ambiental (BRASIL, 2010b; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; SANDLE et al., 2013).

A capacidade de identificar microrganismos tem sido essencial para a medicina desde a descoberta desses seres como formas de vida diminutas, invisíveis a olho nu, causadoras de doenças e de deterioração de alimentos. Apesar de comumente serem associados a efeitos maléficos, os microrganismos também desempenham um importante papel na manutenção do equilíbrio ambiental e em aplicações comerciais, tanto na indústria de alimentos quanto na química e na de biotecnologia (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Assim, desvendar a nomenclatura de uma colônia microbiana acarreta implicações que por vezes podem ter efeitos de longo alcance.

Na área médica, por exemplo, a identificação de um isolado a partir de um espécime clínico leva a implicações associadas à patogenicidade, ao risco de contágio, ao diagnóstico, à formas de tratamento e à prevenção. Em um laboratório de pesquisa, a consequência recai sobre a maneira pela qual o microrganismo será manipulado, considerando quais medidas protetivas deverão ser tomadas para impedir a disseminação para a comunidade científica. Na área da biotecnologia, os aspectos impactantes são relacionados a aplicação dos microrganismos, segurança e custo na manipulação dos mesmos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Na área farmacêutica, a identificação microbiana exerce um papel fundamental. Quando encontrados em princípios ativos, excipientes, água grau farmacêutico, ambiente de produção, produto intermediário ou final, os microrganismos são normalmente submetidos a caracterização. Essa avaliação tem sua base na determinação de propriedades dos microrganismos isolados, como morfologia da colônia, morfologia celular, reação a coloração de Gram e certas reações bioquímicas (por exemplo, atividades da oxidase, catalase e coagulase), que podem ser informações suficientes para fins de avaliação de risco, principalmente de produtos não estéreis. No entanto, em alguns casos, é necessário ter um conhecimento mais aprofundado sobre o microrganismo em

questão, exigindo a comparação de suas características com aquelas de microrganismos conhecidos disponíveis em bases de dados e na literatura científica. Havendo correspondência entre as características do isolado e de algum microrganismo já descrito, é possível concluir a sua identidade taxonômica a nível de gênero e/ ou espécie (USP, 2015).

Essa medida de controle quanto à contaminação microbiana se tornou uma exigência das agências regulatórias após um histórico de problemas e investigações relacionadas à contaminação microbiana de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos por microrganismos que podem afetar a qualidade do produto e a segurança do paciente. Assim, testes que permitem a enumeração e identificação de microrganismos são empregados pelos laboratórios de microbiologia farmacêutica, a fim de prover informações microbiológicas tanto no processo de fabricação quanto no produto terminado, possibilitando o controle microbiológico de qualidade (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A identificação microbiana é definida pela *United States Pharmacopeia* (USP) 38 capítulo <1113> como a determinação do grupo amplo (por exemplo, bactérias, fungos ou leveduras) ou grupo restrito (por exemplo, gênero e/ou espécie) ao qual o isolado laboratorial pertence. Desta forma, ela é feita basicamente conforme o seguinte mecanismo: a colônia isolada, seja de amostra clínica, ambiental ou alimentar, é analisada com o objetivo de compilar suas propriedades referentes à morfologia, bioquímica, fisiologia, biologia molecular e ecologia (fonte e *habitat* do isolado microbiano). Uma vez que é feita a caracterização do isolado, as propriedades compiladas são comparadas com aquelas de microrganismos conhecidos disponíveis em bases de dados e na literatura científica. Havendo correspondência entre as características do isolado e de algum microrganismo já descrito, é possível concluir a sua identidade taxonômica, atribuindo-lhe uma nomenclatura (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As características microbianas compiladas para fins de identificação não precisam obrigatoriamente abordar todas as particularidades do isolado. Geralmente, a análise microbiológica é baseada em um destes dois aspectos: caracterização fenotípica ou caracterização genotípica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A caracterização fenotípica é feita a partir de métodos que

detectam características observáveis resultantes da expressão gênica de um microrganismo, como condições de crescimento – relativas, por exemplo, a ausência ou presença de oxigênio e aos componentes necessários no meio de cultura – e morfologia da célula e da colônia. A caracterização genotípica, por sua vez, é fundamentada em métodos que empregam a biologia molecular, ou seja, são analisadas particularidades do genoma microbiano, como o sequenciamento de RNA ribossômico (rRNA) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Na microbiologia farmacêutica, as bactérias e fungos são isolados de produtos, excipientes e monitoramento ambiental. Os testes de identificação microbiana utilizados no controle microbiológico de qualidade de produtos farmacêuticos tem a função de avaliar a presença indesejável de determinadas cepas microbianas, escolhidas por serem patógenos conhecidos (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*), indicadores de contaminação fecal (*Escherichia coli*) ou indicadores de baixos níveis de higiene (*Staphylococcus aureus*). Além disso, estes testes também identificam microrganismos isolados do ambiente, principalmente de produções assépticas, onde a presença dos mesmos é crítica devido à impossibilidade de utilizar a esterilização final nos produtos estéreis (BRASIL, 2010b).

Muitas tecnologias destinadas à identificação microbiana, com distintos níveis evolutivos e aplicando recursos variados têm sido desenvolvidas. Nos primórdios desse processo evolutivo, as pesquisas foram dirigidas e aplicadas à área clínica, dada a importância fundamental de se salvar vidas graças à identificação e à antibioticoterapia correta a ser aplicada. Na sequência, grande direcionamento de esforços ocorreu na área de alimentos: a natureza e origem dos insumos empregados nesse segmento proporcionam ocorrência de grande gama de contaminantes. Por fim, todo direcionamento atual tem por objetivo os medicamentos, grupo complexo quanto a vias de administração, grupos de risco distintos, entre outros. Porém, a implementação das novas tecnologias na área farmacêutica tem sido delongada devido ao ambiente altamente regulado em que a indústria farmacêutica trabalha, com abordagem conservadora, e à necessidade de rígidos requisitos de validação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Pode-se considerar como tendência irreversível na área farmacêutica o desenvolvimento de métodos rápidos em microbiologia por parte das companhias farmacêuticas, uma vez que, atualmente, estão em busca de novas e mais eficientes ferramentas para agilizar e aperfeiçoar o nível de qualidade dos resultados de análises, inclusive as de identificação microbiana. Adicionalmente, as agências regulatórias dirigem esforços nesta mesma tendência, com o intuito do incremento da segurança de pacientes em geral. Além de reduzirem o tempo de análise, estes métodos são mais assertivos e eficientes, demandam pequena quantidade de material e reduzem o valor agregado a análise (PDA, 2013).

Atualmente, os métodos clássicos de identificação microbiana disponibilizados para os laboratórios de controle microbiológico farmacêutico e aceitos pelas autoridades regulatórias, baseiam-se em métodos de cultivo demorados e trabalhosos (MILLER, 2010; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Adotando-se a comparação bioquímica e fisiológica de determinadas características, como morfologia das colônias e potencial para fermentar certos açúcares, pode-se obter um perfil dos microrganismos presentes nas salas limpas, porém estes métodos convencionais costumam ser demorados, podendo levar até seis semanas para se obter o resultado. Assim, se faz necessária a busca constante por novas tecnologias para que se possa acelerar este tempo de resposta (JASSON, et al., 2010; SANDLE, 2014).

O desenvolvimento de métodos rápidos em microbiologia é um meio para se obter resultados mais precisos em menos tempo, tornando o controle de qualidade microbiológico mais efetivo (MILLER, 2010). Diferentes tecnologias originaram produtos destinados a identificação rápida de microrganismos empregando métodos de identificação baseados no fenótipo ou no genótipo microbianos. Os primeiros podem utilizar ensaios bioquímicos (galerias API®, sistema BBL Crystal®, VITEK® e OmniLog® ID), reações imunológicas (VIDAS®), perfis de ácido graxo (Sherlock®) e espectros produzidos por diferentes microrganismos (espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF). Os últimos são sistemas baseados em biologia molecular, como Gene-Trak®, BAX®, MicroSeq® e Riboprinter® (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Das técnicas disponíveis para métodos rápidos e automatizados, a espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF (do inglês, *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*) (MALDI-TOF MS) é a que desperta o mais elevado interesse. Figurando entre as técnicas físico-químicas que possibilitam a detecção e caracterização de microrganismos, ela apresenta uma combinação única de rapidez, alta especificidade e excelente sensibilidade, essenciais para análise microbiana. Esses atributos combinados com sua pronta adaptabilidade à análise direta de fungos e bactérias e demanda por reagentes de baixo custo fazem desta técnica uma opção atrativa para os laboratórios de microbiologia clínica, farmacêutica, ambiental e de alimentos (BUCHAN; LEDEBOER, 2014).

Considerando a transição que vem ocorrendo há alguns anos dos métodos microbiológicos tradicionais para as tecnologias emergentes, o presente trabalho pretendeu realizar um levantamento dos métodos microbiológicos rápidos disponíveis para a identificação microbiana no âmbito dos laboratórios farmacêuticos de controle de qualidade, assim como comparar dois métodos rápidos com princípios diferentes. A vantagem dessa comparação se encontra não apenas na demonstração da aplicabilidade das duas técnicas para análises de monitoramento ambiental, mas também, na identificação, sob o prisma da adequabilidade, de qual é a melhor para o contexto estudado. A escolha do campo da biotecnologia e, especificamente, das vacinas para o estudo se deu pelas inovações que estão sendo alcançadas nessa área, pelos esforços de autoridades e pesquisadores brasileiros no desenvolvimento e produção de imunobiológicos e pela estrita ligação entre a produção biotecnológica e o processamento asséptico, uma vez que um dos atributos essenciais desses produtos é a esterilidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biotecnologia para a saúde humana: produção de vacinas

O termo Biotecnologia sugere um ramo moderno da tecnologia onde agentes biológicos (organismos, células, organelas, moléculas) são empregados para obter bens ou assegurar serviços por meio de processos complexos controlados por equipamentos sofisticados. No entanto, há milhares de anos a humanidade tem intuitivamente utilizado os processos biológicos para a produção de alimentos, bebidas e drogas, baseada apenas no conhecimento empírico, sem qualquer fundo científico, antes mesmo que a existência dos microrganismos tivesse sido reconhecida e estudada no século XIX (PALOMARES; CRAMERI; RHYNER, 2014; REIS et al., 2009). Registros da civilização babilônica já indicavam a utilização de leveduras na produção de pães e cerveja cerca de 4 500 anos antes de Cristo. Mesmo que rudimentares, o domínio sobre os processos de fermentação utilizados para a produção de queijos, vinhos, pães e iogurtes já eram aplicações biotecnológicas (CARDOSO, 2015).

É certo que com o aprofundamento do conhecimento científico sobre os processos biológicos, iniciado a partir da segunda metade do século XX, a ciência pôde compreender mais claramente uma série de fenômenos e promover o desenvolvimento de novas tecnologias consideradas impactantes para o setor produtivo e, conseqüentemente, para a sociedade (REIS et al., 2009). Dessa forma, a biotecnologia pôde ser dividida em duas vertentes: a clássica e a moderna. Na biotecnologia clássica encontra-se um conjunto de atividades que o homem vem desenvolvendo há milhares de anos, como a já citada produção de alimentos fermentados. Na biotecnologia moderna são empregadas tecnologias de engenharia genética, DNA recombinante, cultura de células e embriões para o desenvolvimento de produtos e processos. Assim, com aplicações em diversos segmentos produtivos, a biotecnologia é hoje um campo emergente com grande concentração de conhecimento, possibilitando importantes avanços, sobretudo nas áreas agrícola, de saúde e meio ambiente (ROSSI, 2012).

Na área da saúde, os processos biotecnológicos dão origem a uma gama de produtos como vitaminas, antibióticos, agentes de redução do colesterol ou estatinas, inibidores enzimáticos, imunossupressores, compostos antitumorais, proteínas recombinantes e vacinas. Os antibióticos obtidos por biotecnologia ultrapassam a quantidade de 160 e novos bioprocessos tem sido continuamente desenvolvidos para a produção dessas drogas e dos produtos citados anteriormente, além de seus precursores. A vitamina B12 (riboflavina), por exemplo, passou a ser produzida pela bactéria *Bacillus subtilis* através de um processo com impacto ambiental muito menor quando comparado com a produção convencional e com melhor rendimento. Na Tabela 1 são evidenciados alguns exemplos de produtos biofarmacêuticos e suas indicações terapêuticas (GAVRILESCU; CHISTI, 2005).

Tabela 1. Exemplos de produtos biofarmacêuticos e suas indicações terapêuticas.

Produto	Nome comercial	Forma farmacêutica	Indicação terapêutica
Eritropoetina	Hemax® Eritron 4000UI	Pó injetável liofilizado	Anemia
Insulina	Novolin® R	Solução injetável	Diabetes
Fatores de coagulação do sangue	Advate®	Pó injetável liofilizado	Hemofilia
Fator estimulante da colônia	Filgrastim®	Solução injetável	Neutropenia
Interferon beta	Rebif®	Pó injetável liofilizado	Esclerose múltipla
Interferon alfa	Interferon Alfa-2b Humano Recombinante®	Pó injetável liofilizado	Câncer e hepatite
Hormônio do crescimento	Somatrop®	Pó injetável liofilizado	Distúrbios de crescimento
Vacina terapêutica contra hepatite B	Engerix® B	Solução injetável	Imunização ativa contra a infecção pelo vírus da hepatite B

Fonte: Adaptado de GAVRILESCU; CHISTI, 2005.

Um dos impactos causados pelo advento da biotecnologia moderna foi uma mudança significativa na pesquisa e desenvolvimento de novas vacinas. Tais mudanças refletem avanços na descoberta de novos antígenos,

adjuvantes, vetores ou sistemas de entrega, tornando as formulações mais seguras e eficazes. No Brasil, apesar dos incentivos e ações governamentais, a produção de imunobiológicos ainda enfrenta limitações de caráter tecnológico que dificultam a internalização dessa produção. Assim, os poucos medicamentos biológicos fabricados em território nacional são produzidos principalmente por instituições públicas, de forma preponderante a partir de contratos de transferência de tecnologia. Entre as instituições de maior destaque na produção de imunobiológicos estão o Instituto Butantan, órgão público ligado à Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, que é responsável pela produção de importantes vacinas, e o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, reativos e biofármacos voltados para atender prioritariamente às demandas da saúde pública nacional (BIOMANGUINHOS, 2015; INSTITUTO BUTANTAN, 2014; REIS et al., 2009).

Dentre as estratégias empregadas para enfrentar os desafios da saúde pública, a vacina encontra-se entre as mais relevantes. Nenhuma outra intervenção médica possuiu um histórico tão inequívoco de prevenir morbidade e mortalidade por doenças infecciosas como as vacinas (MOXON et al., 2011). Em 2011, estavam disponíveis cerca de 25 vacinas licenciadas para prevenir infecções humanas causadas por diferentes microrganismos. Atualmente, este número é muito maior devido às combinações entre elas e às formulações destinadas a diferentes faixas etárias e regiões geográficas. Embora ainda haja questões relativas a efetividade desses produtos, é certo que sua contribuição foi substancial para as melhorias observadas na saúde pública ao longo do século passado (SMITH; LIPSITCH; ALMOND, 2011).

A vacinação sazonal contra o vírus *Influenza*, por exemplo, tem promovido uma redução drástica nas infecções causadas por este patógeno, desde de sua primeira administração na década de 40. Entretanto, significativa morbidade e mortalidade ainda ocorrem (KAUR; SULLIVAN; WILSON, 2011). Em 2016, foram notificados no Brasil 12.174 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave por *Influenza*. Destes, 2.220 (18,2%) evoluíram para óbito, apesar de 1.711 (77,1%) terem feito uso de terapia antiviral (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016). Infelizmente, o tratamento de infecções

causadas por *Influenza* com drogas antivirais não é uma opção confiável, pois frequentemente é inefetivo e leva a vírus resistentes. Assim, apesar de suas limitações, a prevenção por meio da vacinação ainda é a medida protetiva principal contra a *Influenza* (KAUR; SULLIVAN; WILSON, 2011).

A descoberta das vacinas como um importante meio para a prevenção de doenças está intrinsecamente ligada a uma moléstia que devastou a humanidade por muitos anos: a varíola. Embora a origem histórica da imunização seja frequentemente esquecida frente aos rápidos avanços no desenvolvimento de vacinas nas últimas décadas, foi pelo trabalho notável do pesquisador Edward Jenner e daqueles subsequentes aos seus esforços que hoje várias doenças graves, inclusive a que favoreceu a descoberta das vacinas, estão erradicadas e outras podem ser eficazmente prevenidas por meio da imunização (RIEDEL, 2005).

Os primeiros esforços para conferir *status* científico ao procedimento de imunizar e desta forma dar prosseguimento às pesquisas neste âmbito se deram no final do século 18 (RIEDEL, 2005). Entretanto, até a metade da década de 1970 o uso de vacinas ainda era limitado e irregular tanto no Brasil quanto no mundo. As doenças imunopreveníveis tinham importante magnitude enquanto problemas de saúde pública e as baixas coberturas vacinais eram insuficientes para promover impacto sobre as doenças (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013).

Em 1973, foi então organizado no Brasil um programa com a missão de coordenar, em âmbito nacional, as ações de vacinação, chamado Programa Nacional de Imunizações (PNI). Por meio dele foram obtidos vários êxitos neste campo, como o primeiro calendário nacional de vacinação, publicado em 1977, regulamentando as vacinas obrigatórias do primeiro ano de vida, e a 'erradicação' da poliomielite, no ano de 1994, como resultado da adoção de estratégias de vacinação de rotina na Rede Básica de Saúde e de vacinação em massa, em parcerias com outras instituições públicas e privadas. Em 2014, o PNI passou a oferecer 43 imunobiológicos, entre vacinas, soros e imunoglobulinas (SANTOS; MARIA, 2014).

Atualmente, o Brasil está entre os países que oferecem gratuitamente o maior número de vacinas para sua população, garantindo a sua oferta com segurança e eficácia para todos os grupos populacionais que são alvo de

ações de imunização, como crianças, adolescentes, adultos, idosos e indígenas. São disponibilizadas por ano mais de 300 milhões de doses de imunobiológicos. Dentre as conquistas mais louváveis do PNI está a manutenção da aquisição centralizada de vacinas, que permite aos municípios mais pobres do País o cumprimento exato do mesmo calendário vacinal que os municípios mais ricos, promovendo a equidade (SILVA JUNIOR, 2013).

O PNI também favoreceu o desenvolvimento de um parque produtor nacional, atualmente responsável por 96% das vacinas oferecidas à população pelo Programa (SILVA JUNIOR, 2013). Considerado um importante patrimônio do País, este parque produtor coloca o Brasil em situação privilegiada e vantajosa em relação a outros países do mundo e ainda possibilita o desenvolvimento científico e tecnológico (FIOCRUZ, 2014). Isso foi possível graças ao Programa de Auto-Suficiência Nacional em Imunobiológicos (PASNI), criado em 1983, que investiu na ampliação, modernização e melhoria da qualidade da produção nacional, envolvendo os seguintes laboratórios brasileiros: Bio-Manguinhos, situado no Rio de Janeiro; Instituto Butantan, situado em São Paulo; Instituto Vital Brazil – IVB, situado no Rio de Janeiro; Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR; e a Fundação Ezequiel Dias – FUNED, situado em Minas Gerais (HOMMA; MOREIRA, 2008).

Ao longo de 40 anos de trajetória, o PNI consolidou-se como coordenador das ações de vacinação e contribuiu grandemente para a redução da morbidade e mortalidade por doenças transmissíveis no Brasil. O êxito de suas ações rendeu-lhe não apenas reconhecimento e respeitabilidade nacional, mas fizeram dele um programa de Saúde Pública de referência para vários países. Este grande sucesso somente pôde ser alcançado com a priorização da política de vacinação dentre as políticas públicas de saúde e com o apoio indispensável da população às ações de vacinação (DOMINGUES; TEIXEIRA, 2013; SILVA JUNIOR, 2013).

A chave para o sucesso de quase todas as vacinas atualmente em uso é a resposta anticórpica (PLOTKIN, 2009). No caso das vacinas virais, por exemplo, a indução a produção de anticorpos por linfócitos B reduz a infectividade dos vírus e restringe a replicação viral no organismo humano. Isso porque certos anticorpos são capazes de neutralizar diretamente o vírus por meio da ligação a proteínas importantes do ciclo de vida viral, inibindo sua

função. Tais proteínas são denominadas antígenos, por serem capazes de ativar uma resposta imune, possuindo em sua estrutura uma pequena região responsável pela ligação específica com os anticorpos, denominada epítopo (KAUR; SULLIVAN; WILSON, 2011).

Cada antígeno pode conter um ou mais epítopos, iguais ou diferentes, sendo que a presença de epítopos diferentes pode desencadear uma produção de anticorpos com diferentes especificidades. Entretanto, isso geralmente não acontece, uma vez que somente alguns poucos epítopos podem ativar a resposta imune por questões de posicionamento favorável na superfície do antígeno. Quando antígenos de uma única cepa viral são utilizados na composição de uma vacina, dá-se origem a forma monovalente da mesma. Se são feitas combinações de antígenos de cepas virais diferentes, a vacina pode ser bivalente ou trivalente, dependendo da quantidade de variantes do vírus empregadas (PLOTKIN, 2009).

2.2 Boas práticas de fabricação na produção de imunobiológicos

Todos os produtos farmacêuticos devem ser fabricados respeitando-se condições específicas de higiene e limpeza, que variam conforme as particularidades do produto. Entretanto, quando se trata exclusivamente de processos que exigem a manutenção da assepsia durante a manipulação mecanizada ou manual, devido a natureza termossensível dos componentes do produto, o controle ambiental se torna muito mais crítico em termos de risco para o paciente. A aplicação da biotecnologia na obtenção de produtos biofarmacêuticos, por exemplo, têm conduzido a grande demanda de áreas controladas, pois a maior parte dos produtos biológicos, incluindo as vacinas, são administrados pela rota parenteral e requerem a condição de esterilidade. (BRASIL, 2010b; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; USP, 2015).

Os procedimentos operacionais utilizados na produção de vacinas são realizados em áreas classificadas conforme normas internacionais, como as da ISO (do inglês, *International Organization for Standardization*), e nacionais como as da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estes guias recomendam a adoção de Boas Práticas de Fabricação (BPF), que contribuirão

para a obtenção de um produto seguro e com alto nível de qualidade (UTESCHER et al., 2007).

2.2.1 Salas limpas

O conceito de sala limpa surgiu da necessidade de um ambiente adequado para a realização de atividades sensíveis à contaminação. Tanto na indústria farmacêutica quanto na aeroespacial, na microeletrônica, na de dispositivos médicos e na alimentícia, há produtos e processos que carecem de um controle de contaminação de partículas do ar, uma vez que na ausência deste cuidado pode haver graves desvios de qualidade, com consequências que variam conforme as particularidades de cada produto (BRASIL, 2010b; USP, 2015).

O controle de contaminação de partículas do ar é essencial num ambiente de produção devido a frequência com que são encontradas células microbianas associadas a partículas de 10 a 20 μm), tais como pó ou detritos de pele humana (BRASIL, 2010b). Além disso, há relatos da ocorrência da combinação de bactérias suspensas no ar, formando partículas grandes (THAM; ZURAIMI, 2005). Assim, como em qualquer ambiente não controlado, nas salas limpas também pode haver a formação de aerossol de partículas de diferentes origens, às quais estarão associados contaminantes microbianos, e por isso um controle rigoroso da quantidade de partículas no ar é imprescindível para evitar a contaminação do produto por meio de correntes de ar ou de efeitos gravitacionais (SANDLE et al., 2014).

A norma NBR ISO 14644 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) define sala limpa como “sala na qual a concentração de partículas em suspensão no ar é controlada; é construída e utilizada de maneira a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas dentro da sala, na qual outros parâmetros relevantes, como, por exemplo, temperatura, umidade e pressão, são controlados conforme necessário.” Esta norma classifica as salas limpas de acordo com o nível de limpeza do ar, e isso é feito exclusivamente em termos de concentração de partículas em suspensão. As populações de partículas consideradas para este fim são somente aquelas que se encontram

dentro de uma faixa determinada de tamanhos, de 0,1 μm a 5,0 μm (ANVISA, 2013).

Cada grau de classificação recebe um número (N) e é expresso como ISO classe N. A faixa de classificação definida pela norma é de ISO classe 1 à ISO classe 9, sendo que quanto mais baixo o número de classificação, maior o nível de limpeza do ar. Assim, cada classe representa a concentração máxima admissível para os tamanhos de partículas considerados (Quadro 1). Esta concentração é dada em número de partículas por metro cúbico de ar e é calculada de acordo com uma fórmula que relaciona o número de classificação ISO (N), o tamanho da partícula em questão e uma constante. Além disso, leva-se também em consideração o estado de ocupação da sala, sendo eles “como construído”, “em repouso” e “em operação”. A classificação pode ser especificada ou realizada em qualquer um dos três estados (ABNT, 2005).

Quadro 1. Classes de limpeza do ar para partículas em suspensão, selecionadas para salas e zonas limpas.

Número de classificação ISO (N)	Limites máximos de concentração (partículas/ m^3 de ar) para partículas iguais ou maiores que os tamanhos considerados					
	0,1 μm	0,2 μm	0,3 μm	0,5 μm	1 μm	5 μm
ISO Classe 1	10	2				
ISO Classe 2	100	24	10	4		
ISO Classe 3	1 000	237	102	35	8	
ISO Classe 4	10 000	2 370	1 020	352	83	
ISO Classe 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29
ISO Classe 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
ISO Classe 7				352 000	83 200	2 930
ISO Classe 8				3 520 000	832 000	29 300
ISO Classe 9				35 200 000	8 320 000	293 000
NOTA Devido às incertezas relacionadas ao processo de medição, na definição da classe de limpeza não são utilizados mais que três algarismos significativos nos valores de concentração.						

Fonte: Extraído de ABNT, 2005.

Portanto, a designação da limpeza requerida do ar para partículas em suspensão em salas limpas deve conter os seguintes itens:

- o número de classificação, expresso como ISO classe N;
- o estado de ocupação para o qual a classificação é aplicada;
- e o(s) tamanho(s) considerado(s) das partículas juntamente com a respectiva concentração, como é mostrado no Quadro 1.

Exemplo: ISO classe 4; em operação; tamanhos considerados: 0,2 μm (2 370 partículas/ m^3), 1 μm (83 partículas/ m^3) (ABNT, 2005).

A resolução RDC nº 17/2010 utiliza o sistema de classificação das salas limpas farmacêuticas da OMS. Nele, as áreas limpas devem ser classificadas de acordo com o número de partículas em suspensão no ar com diâmetros de 0,5 μm e 5,0 μm , em dois estágios diferentes de ocupação da sala: “em operação” e “em repouso” (Quadro 2). Por este motivo, as Resoluções publicadas pela ANVISA utilizam a classificação das salas limpas em graus A, B, C e D, e não em classes numéricas, como faz a ISO 14644. Da mesma forma, a United States Federal Standard 2009 possui seu próprio sistema de classificação em classes 10, 100, 10.000 e 100.000. No Quadro 3 é possível verificar a equivalência entre os diferentes sistemas internacionais de classificação de partículas para salas limpas disponíveis atualmente (ANVISA, 2013).

Quadro 2. Sistema de classificação do ar para a produção de produtos estéreis, conforme a RDC nº 17/ 2010.

Graus	Em repouso		Em operação	
	Nº máximo de partículas permitido/ m^3		Nº máximo de partículas permitido/ m^3	
	$\geq 0,5 \mu\text{m}$	$\geq 5,0 \mu\text{m}$	$\geq 0,5 \mu\text{m}$	$\geq 5,0 \mu\text{m}$
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	Não definido	Não definido

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2010a.

Quadro 3. Comparação entre os diferentes sistemas de classificação para áreas limpas, em repouso.

OMS – BPF*	Estados Unidos (habitual)	ABNT NBR ISO 14644-1**	EC – GMP***
Grau A	Classe 100	ISO 5	Grau A
Grau B	Classe 100	ISO 5	Grau B
Grau C	Classe 10.000	ISO 7	Grau C
Grau D	Classe 100.000	ISO 8	Grau D

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2010a.

Notas:

*Organização Mundial da Saúde – Boas Práticas de Fabricação.

**Norma NBR ISO 14644-1 da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

***EC- GMP = *European Commission – Good Manufacturing Practice*.

A classificação das áreas limpas em graus possui os seguintes critérios: o grau A é dado para zonas de alto risco operacional, como envase e conexões assépticas; o grau B é dado para áreas circundantes às de grau A para preparações e envase assépticos; e os graus C e D são dados para áreas limpas onde são realizadas etapas menos críticas na fabricação de produtos estéreis, como as anteriores à filtração esterilizante (Figura 1) (BRASIL, 2010a).

Figura 1. Critérios para classificação das áreas limpas.

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2010a.

A RDC nº17/2010 também determina que a classificação das salas limpas leve em consideração a quantidade de partículas viáveis (ou microrganismos), independentemente do estado de ocupação da sala no momento de realização da amostragem. O Quadro 4 apresenta os limites de contaminação microbiana para cada grau de classificação. Este é o grande diferencial entre ambientes da área eletrônica, aeroespacial e a farmacêutica,

onde torna-se relevante o conceito de ambientes com contaminação microbiana monitorada.

Quadro 4. Limites para contaminação microbiana em unidades formadoras de colônias (UFC).

Graus	Amostra de ar (UFC/m ³)	Placas de sedimentação (diâmetro de 90 mm) (UFC/4horas)	Placas de contato (diâmetro de 55 mm) (UFC/placa)	Teste de contato das luvas (5 dedos) (UFC/luva)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2010a.

Apesar de serem considerados apenas dois estados de ocupação das salas limpas pela legislação vigente, são definidos três estágios para identificação das mesmas: “como construído”, “em repouso” e “em operação”. A condição “como construído” é aquela em que a instalação está completa, com todos os serviços interligados e funcionando, mas na ausência de equipamentos de produção, material ou pessoal. A condição “em repouso” é aquela em que a instalação está completa, com equipamentos de produção instalados e operando, mas na ausência de pessoal. A condição “em operação” é aquela em que a instalação está funcionando conforme as condições especificadas, com um número determinado de pessoas presentes (ABNT, 2005; BRASIL, 2010a).

Para alcançar as condições “em operação”, as áreas devem ser planejadas de modo a atingir os níveis indicados de pureza do ar na condição “em repouso” (BRASIL, 2010a). Vários fatores estão envolvidos na obtenção destes níveis, por exemplo: os materiais de construção e acabamento das salas não podem ser porosos, nem geradores de partículas; as superfícies, além de serem lisas, devem ser laváveis, impermeáveis e resistentes aos agentes de limpeza; e deve haver um sistema de tratamento de ar, conhecido como HVAC (do inglês, *heating, ventilation and air-conditioning*), para atender aos requisitos de qualidade do ar e garantir um bom funcionamento da sala, mantendo o controle da temperatura, umidade relativa, pressurização, fluxo de ar, entre outras funções (ANVISA, 2013).

É importante observar que o estado “como construído” é aplicado a salas limpas recém-completadas ou recém-modificadas. Depois de concluídos os ensaios neste estado, os demais ensaios serão realizados nos estados “em repouso” ou “em operação” ou em ambos, para verificar a conformidade com a especificação (ABREU, 1999).

2.2.1.1 Programa de Monitoramento Ambiental

Para atender a sua condição de ambiente controlado, as salas limpas exigem um sistema robusto de controle ambiental, que terá por funções a minimização e controle da geração de partículas e contaminação microbiana nas áreas classificadas assim como a prevenção da transferência de qualquer contaminação para áreas críticas e proteção do produto. Desta forma, são imprescindíveis o emprego de um sistema HVAC apropriado, para possibilitar a qualidade do ar requerida, e a disciplina comportamental estrita do pessoal atuante nas salas limpas, para evitar a contaminação tanto do ar quanto de superfícies. Embora a ênfase do controle ambiental deva estar nessas medidas, elas por si só não são suficientes. A compreensão da extensão na qual o controle ambiental está sendo mantido é essencial para o bom funcionamento das salas limpas e apenas pode ser alcançada com o estabelecimento de um Programa de Monitoramento Ambiental robusto (SANDLE et al., 2014; UTESCHER et al., 2007).

Um Programa de Monitoramento Ambiental tem a função primordial de detectar um evento adverso nas condições microbiológicas das áreas limpas a tempo de permitir ações corretivas significativas e efetivas. Ele é inteiramente de responsabilidade do fabricante e deve ser feito sob medida para as condições e instalações específicas (BRASIL, 2010b). Por meio dele, são feitas avaliações microbiológicas da qualidade do ar, dos operadores e de superfícies, possibilitando o controle da carga microbiana viável e o fornecimento de dados sobre a eficiência do sistema de ar e postura do pessoal nas áreas limpas (UTESCHER et al., 2007).

O próprio fabricante deve estabelecer, por meio de processos estatísticos, os limites microbiológicos de alerta e ação para as áreas limpas. Estes, no entanto, devem ser inferiores aos especificados pela legislação

vigente, conforme os graus de classificação das áreas (Quadro 4). Os cálculos se baseiam normalmente em informações históricas obtidas de operações de rotina do processo em um ambiente controlado específico. O nível de alerta evidencia nível de contaminação significativamente superior às condições de operações normais. Exceder este nível não exige necessariamente uma ação corretiva, entretanto, deve-se ao menos realizar uma investigação de acompanhamento documentada, que pode incluir modificações no plano de amostragem. Já o nível de ação, quando excedido, requer acompanhamento imediato e, se necessário, ação corretiva (BRASIL, 2010b).

Os locais de monitoramento são determinados com base em análise de risco. Considera-se a proximidade do produto e a possibilidade do ar e superfícies existentes na sala entrarem em contato com ele. Os métodos de amostragem empregados em cada ponto de monitoramento devem ser validados e a frequência de amostragem dependerá da criticidade dos locais especificados (BRASIL, 2010b; USP, 2015). Geralmente, é utilizada uma combinação de contagem de partículas não viáveis e métodos tradicionais de amostragem microbiológica (SANDLE et al., 2014).

A avaliação do ar para partículas viáveis pode ser feita por amostragem passiva e ativa. Na amostragem passiva, placas de Petri contendo meio de cultura ficam expostas ao ambiente de uma área limpa por períodos de aproximadamente quatro horas, a fim de monitorar os microrganismos que se acomodam nas mesmas. Uma vez que a maior parte deles está associada a partículas de 12 μm de diâmetro ou maiores, há peso suficiente para a deposição por efeito da gravidade. Na amostragem ativa, são utilizados equipamentos que permitem quantificar os microrganismos presentes em um determinado volume de amostra de ar. Por este motivo, esta técnica de amostragem também é denominada como “volumétrica” (UTESCHER et al., 2007).

Quando se trata de amostragem passiva, é importante considerar que o resultado de 1 unidade formadora de colônia (UFC), por exemplo, não significa necessariamente a presença de apenas uma célula microbiana viável; podem haver dezenas ou centenas de células microbianas viáveis numa única partícula, originando uma única colônia. Esse aspecto restringe a comparação consistente do método de amostragem passiva com os de amostragem ativa.

Entretanto, o valor da avaliação qualitativa do ambiente proporcionada pela amostragem passiva em períodos prolongados é indiscutível (HALLS, 2004). Além disso, as placas de sedimentação podem ser particularmente úteis em áreas críticas, onde a amostragem ativa pode oferecer risco para o processo asséptico (USP, 2015).

De forma geral, os dispositivos que fazem a amostragem ativa do ar utilizam vácuo para aspirar um volume de ar conhecido sobre uma placa de Petri contendo meio ágar nutrienste. Esse volume pode variar conforme requisitos específicos da amostragem. As partículas viáveis são então incubadas a temperaturas predefinidas para suportar o crescimento e, após a incubação, todas as colônias recuperadas são contadas e registradas. O número resultante de UFCs é expresso como o número de UFCs por unidade de volume de ar amostrado, sendo que o resultado refere-se somente à amostra tomada e não pode ser extrapolado a cada unidade de volume de ar (ANDON, 2006).

Existem, atualmente, vários modelos de amostradores de ar. A escolha e adequação ao uso de qualquer um deles são de responsabilidade do usuário, ou seja, o próprio fabricante do produto estéril (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). A USP 38 detalha os principais modelos:

- *Slit-to-agar Air Sampler*: o amostrador de ar do tipo *Slit-to-agar* é movimentado por uma fonte anexa de vácuo controlável. A quantidade de ar coletada é obtida por meio de uma abertura padronizada abaixo da qual é colocada uma Placa de Petri contendo meio ágar nutrienste que se move lentamente. As partículas com massa suficiente impactam a superfície do ágar, possibilitando o crescimento dos microrganismos (Figuras 2 e 3).

Figura 2. Representação esquemática do amostrador de ar do tipo *Slit-to-Agar*.

Fonte: Adaptada de HALLS, 2004.

Figura 3. Amostrador de ar do tipo *Slit to Agar* vendido comercialmente.

Fonte: Extraída de ALPHA CONTROLS & INSTRUMENTATION INC., 2017.

- *Sieve Impactor*: o amostrador de ar do tipo *Sieve Impactor* consiste de um dispositivo de impactação que aspira o ar através de uma placa de metal perfurada, desenhada especialmente para acomodar a placa de Petri contendo meio ágar nutriente. Essa aspiração se dá por meio de uma bomba de vácuo que atrai o volume de ar especificado, causando o impacto das partículas que contém microrganismos no meio de cultura (Figura 4).

Figura 4. Amostrador de ar do tipo *Sieve Impactor* vendido comercialmente.

Fonte: Extraída de DIRECT INDUSTRY, 2017.

- *Centrifugal Air Sampler*: o amostrador de ar do tipo *Centrifugal Air Sampler* contém uma hélice ou turbina que aspira o ar e o impulsiona para o impacto com uma tira de base plástica flexível tangencialmente

posicionada contendo meio ágar nutriente (Figura 5). Essa tira é colocada no interior da peça que sustenta a hélice (Figura 6).

Figura 5. Amostrador de ar do tipo *Centrifugal Air Sampler* e tira de base plástica flexível contendo meio ágar nutriente vendidos comercialmente.

Fonte: Extraída de MERCK MILLIPORE CORPORATION, 2017,

Figura 6. Representação esquemática da peça que contém a hélice do amostrador de ar do tipo *Centrifugal Air Sampler*.

Fonte: Adaptada de HALLS, 2004.

- *Sterilizable Microbiological Atrium*: é uma variante do amostrador de ar do tipo *Sieve Impactor*, uma vez que também possui uma placa de metal perfurada através da qual o ar é aspirado. A diferença está no

tamanho dos orifícios; nesse tipo de amostrador, eles são maiores, medindo cerca de 0,25 polegada de tamanho (Figuras 7 e 8).

Figura 7. Representação esquemática do amostrador de ar do tipo *Sterilizable Microbiological Atrium*.

Fonte: Adaptada de HALLS, 2004.

Figura 8. Amostrador de ar do tipo *Sterilizable Microbiological Atrium* vendido comercialmente.

Fonte: Extraída de VELTEK ASSOCIATES INC., 2017.

A amostragem de superfícies, tanto de equipamentos e áreas como de funcionários, pode ser feita por placas de contato com ágar nutriente ou com *swab*. O primeiro método é utilizado para amostrar áreas planas enquanto o segundo é empregado em superfícies irregulares, especialmente nos equipamentos. É importante considerar que as técnicas de amostragem não podem levar contaminação para as áreas amostradas (BRASIL, 2010b).

Esses métodos, amplamente utilizados no monitoramento ambiental, são baseados no crescimento microbiano, o que demanda tempo para a produção dos resultados. O período de incubação requerido para as placas utilizadas na amostragem pode variar, porém, para uma avaliação significativa do nível de contaminação microbiana, jamais será menor do que dois dias. Em programas de monitoramento ambiental que necessitam da recuperação de bactérias e fungos, esse período pode ser estendido devido a utilização de ágar de uso geral como meio de cultura e incubação dupla, para a recuperação dos dois grupos de microrganismos (SANDLE et al., 2014).

Métodos alternativos podem ser utilizados para avaliar e controlar o estado microbiológico das salas limpas, com diferentes equipamentos e métodos para amostragem microbiológica (BRASIL, 2010b). Sandle e colaboradores (2014), por exemplo, avaliaram um método microbiológico rápido para o monitoramento ambiental constante e em tempo real, baseado numa tecnologia que utiliza a espectroscopia óptica para diferenciar partículas biológicas e partículas inertes. Apesar de apresentar limitações que requerem estudos adicionais, como a impossibilidade de identificar os microrganismos detectados, o instrumento apresenta vantagens sobre os métodos microbiológicos tradicionais, principalmente em relação a rapidez na obtenção dos resultados (SANDLE et al., 2014). Entretanto, é importante atentar para as novas tecnologias, pois a aplicação imprópria de amostragem e de análises microbiológicas pode causar variabilidade significativa assim como potencial para contaminação inadvertida (BRASIL, 2010b).

O pessoal operante nas salas limpas desempenha um importante papel no controle da contaminação. Em qualquer ambiente onde operadores estão presentes, algum nível de contaminação microbiana é inevitável. Por isso, é essencial que estas pessoas sejam treinadas continuamente e conscientizadas das consequências de sua conduta, assim como observadas e avaliadas quando operando em processos assépticos (USP, 2015; UTESCHER et al., 2007).

2.3 Métodos rápidos em microbiologia

Os laboratórios de microbiologia exercem uma importante função na esfera das indústrias farmacêutica, de biotecnologia e de dispositivos médicos, por gerarem informações necessárias para a garantia da qualidade tanto do processo produtivo quanto do produto acabado (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Uma vez que a fabricação de medicamentos, principalmente em se tratando dos estéreis, exige um alto nível de sanitização e higiene, os dados microbiológicos são um importante indicador de controle de processo (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2010b).

Para alcançarem seu propósito, os laboratórios farmacêuticos de microbiologia geralmente utilizam métodos microbiológicos clássicos baseados na recuperação e crescimento de microrganismos em meios de cultura sólidos ou líquidos. Esses testes se dividem em três grandes grupos:

- testes qualitativos para determinar a presença ou ausência de microrganismos viáveis, como o teste de esterilidade, aplicado em produtos e matérias primas estéreis;
- testes quantitativos para a enumeração de microrganismos, como o teste de limite microbiano, também denominado “Contagem do número total de microrganismos mesófilos”, que consiste na contagem da população de microrganismos que apresentam crescimento visível em ágar caseína soja a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em até cinco dias e em ágar Sabouraud-dextrose a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em até sete dias. É aplicado em produtos e matérias primas não estéreis com o objetivo de determinar se estes satisfazem às exigências microbiológicas farmacopeicas;
- testes de identificação, como os métodos clássicos de cultivos em diferentes meios de cultura para caracterização bioquímica e morfológica dos microrganismos (EUROPEAN PHARMACOPOEIA CONVENTION, 2007).

Métodos microbiológicos baseados na recuperação e crescimento de microrganismos usando meios de cultura sólidos ou líquidos envolvem pouca tecnologia e são limitados em seu escopo de detecção. Suas principais limitações envolvem baixas taxas de crescimento microbiano, baixa seletividade do meio de cultura, e variabilidade da resposta biológica inerente

dos microrganismos. Entretanto, a simplicidade, baixo custo, eficiência e longa história de aplicação destes métodos perduram o seu uso a despeito das limitações que apresentam (SANDLE, 2014).

Com o aumento da complexidade e da quantidade dos medicamentos e dispositivos médicos manufaturados, os testes microbiológicos têm desempenhado um crescente papel nos laboratórios farmacêuticos, o que tem levado as empresas a reavaliar suas práticas de trabalho a fim de melhorar a eficiência das análises, reduzir o tempo de liberação dos produtos assim como os custos. Desta forma, técnicas clássicas de microbiologia têm dado lugar a novas tecnologias (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Uma variedade de metodologias rápidas e alternativas emergiu nos últimos anos. Estas podem tanto automatizar métodos microbiológicos existentes quanto fazer uso de novos marcadores ou serem baseadas em tecnologias totalmente novas. As vantagens oferecidas por estas metodologias alternativas recaem principalmente sobre a rapidez na obtenção dos resultados, exatidão, precisão e especificidade quando comparadas com os métodos convencionais, além de serem economicamente mais viáveis (PDA, 2013).

A transição dos métodos microbiológicos tradicionais para os modernos não tem sido aceita tão facilmente. Diante deste quadro, representantes de fabricantes de equipamentos, de produtos farmacêuticos e correlatos, observadores de agências regulatórias e Comitê de Especialistas em Microbiologia Analítica da USP, patrocinados pela *Parenteral Drug Association* (PDA), uniram forças e desenvolveram um relatório, intitulado como PDA Technical Report nº 33 - *Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods* (TR33), publicado em 2000. Este relatório influenciou publicações nas Farmacopeias Americana, Europeia e Japonesa, e por isso hoje os métodos microbiológicos rápidos passaram a ser considerados e implementados na indústria farmacêutica (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

O TR33 tem como proposta preencher a lacuna que impede a adoção generalizada dos métodos microbiológicos rápidos alternativos. Pretendeu-se alcançar este objetivo estabelecendo a forma como deve ser demonstrada a equivalência destes métodos com os já existentes de uma maneira aceitável

para as agências regulatórias, e a forma como deve ser feita a validação do equipamento associado com o método rápido alternativo (PDA, 2013).

A busca pelo aprimoramento dos métodos microbiológicos também influenciou ações por parte da ANVISA. Em sua competência de promover a revisão e a atualização da Farmacopeia Brasileira, essa agência realizou uma Consulta Pública, em julho de 2014, acerca da proposta de um capítulo sobre Métodos Microbiológicos Alternativos, para compor o 1º Suplemento da 5ª edição da Farmacopeia Brasileira. Hoje, esse capítulo encontra-se aprovado e vigente (ANVISA, 2014).

Esta iniciativa está alinhada com outras farmacopeias, regionais ou nacionais, com capítulos já publicados neste âmbito. Tanto na USP quanto na *European Pharmacopeia* (Ph. Eur.) há capítulos que introduzem os passos necessários para a validação de um método microbiológico alternativo (USP *General Information Chapter <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods* e Ph. Eur. *Informational Chapter 5.1.6 Alternative Methods for Control of Microbiological Quality*, respectivamente) (EUROPEAN PHARMACOPOEIA CONVENTION, 2007; USP, 2015).

2.3.1 Métodos rápidos para identificação microbiana

Um dos maiores desafios dos microbiologistas ao longo dos anos tem sido a identificação dos microrganismos. Na clínica, ela é importante na separação entre cepas potencialmente patogênicas e aquelas que não oferecem risco aos seres humanos. No contexto da produção farmacêutica, a identificação microbiana é importante para solucionar casos em que os níveis microbiológicos especificados são excedidos, tanto no monitoramento ambiental quanto na análise do produto acabado, a fim de agregar informações que possibilitem a melhor tomada de decisão para a retomada do estado de controle (BRASIL, 2010b).

A técnica primária para detecção, isolamento e identificação de bactérias no último século tem sido o uso de meios de cultura de enriquecimento e seletivos. Também têm sido utilizados métodos de identificação que dependem sobretudo da morfologia das colônias e de testes bioquímicos. São essas as técnicas que compõem os chamados métodos clássicos, inteiramente

dependentes do crescimento bacteriano, e consequentemente exigentes quanto ao tempo necessário para a obtenção dos resultados (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Nos últimos anos, a evolução dos métodos de identificação utilizados nos laboratórios de microbiologia farmacêutica tem simplificado e automatizado alguns aspectos da identificação microbiana, como o tratamento dos dados e a análise em si. Diversas abordagens modernas foram incluídas nesses métodos, entre elas as reações bioquímicas, a utilização de carbono como substrato, a caracterização dos ácidos graxos que compõem os microrganismos, os padrões de bandas de endonucleases de restrição e a análise da sequência de rRNA 16S (EUROPEAN PHARMACOPOEIA CONVENTION, 2007).

Os métodos rápidos de identificação microbiana podem ser divididos em sistemas de identificação fenotípica e sistemas de identificação genotípica. Os primeiros utilizam os produtos da expressão gênica para distinguir entre os diferentes microrganismos. Para isso, geralmente é necessário um grande número de células provindas de uma cultura pura, o que ocasiona diferentes limitações. Ao dependerem da recuperação e crescimento dos microrganismos, os novos métodos, assim como os clássicos, ainda se encontram sujeitos ao longo tempo de incubação e ao fato de que muitos microrganismos presentes no ambiente não são recuperados pelos meios de cultura usualmente utilizados. Adicionalmente, microrganismos estressados podem não expressar totalmente as suas características fenotípicas ao serem cultivados (USP, 2015).

Os sistemas de identificação genotípica se apoiam nos avanços da biologia molecular, que conduziram a obtenção de resultados de identificação com base no genótipo do microrganismo, não dependendo de variações das condições de crescimento das células microbianas. Os métodos genotípicos são teoricamente mais confiáveis, uma vez que as sequências de ácidos nucléicos são altamente conservadas na maior parte das espécies microbianas. Apesar dessas vantagens, esses métodos são tecnicamente desafiadores para os microbiologistas e também requerem equipamentos analíticos e suprimentos mais dispendiosos, fazendo com que tais análises sejam frequentemente terceirizadas. Portanto, o uso de métodos de

identificação genotípica é tipicamente limitado a investigações microbiológicas críticas, como as de desvio de qualidade do produto (CUNDELL, 2006; FUNG, 2002). Esses métodos não serão abordados na revisão da literatura, pois fogem ao escopo do trabalho.

2.3.1.1 Ensaios bioquímicos

Os métodos rápidos de identificação microbiana baseados em ensaios bioquímicos geralmente são precedidos por uma coloração de Gram, ou outro mecanismo de diferenciação, que direciona o protocolo mais apropriado a seguir. Suspensões de células microbianas são então submetidas a reações bioquímicas a partir de substratos oferecidos e reagentes aplicados. O perfil de reação bioquímica apresentado é comparado com uma base de dados, levando ao resultado de identificação. Apesar de se mostrarem operacionalmente simples, esses métodos podem gerar resultados de interpretação subjetiva (EUROPEAN PHARMACOPOEIA CONVENTION, 2007).

2.3.1.1.1 Sistemas miniaturizados

As galerias API®, produzidas pela bioMérieux, são um exemplo de método baseado em ensaios bioquímicos. Elas consistem em séries de pequenos microtubos contendo substratos desidratados. Quando um pequeno volume de suspensão de células microbianas é dispensado nos tubos, esses substratos são reconstituídos, possibilitando a análise (Figura 9). A galeria é levada para a incubação sob condições apropriadas de tempo e temperatura, e os metabólitos produzidos são revelados por indicadores de pH ou pela adição de reagentes no final da incubação. O perfil de reação bioquímica gerado é convertido em um identificador numérico, conforme instruções do fabricante, tendo por base reações positivas ou negativas dos testes bioquímicos (Figura 10). Esse identificador é colocado numa base de dados que contém uma lista de espécies microbianas com seus respectivos números identificadores; uma vez encontrada uma correlação, é fornecido o resultado (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Figura 9. Galerias API®. Substratos sendo reconstituídos com suspensão de células microbianas.

Fonte: Extraída de CMLAB, 2016.

Figura 10. Leitura dos resultados em uma galeria API®.

Fonte: Adaptada de FARRUKH, 2015.

O sistema comercial BBL Crystal® (Becton Dickinson) segue o mesmo princípio das galerias API®. Também é um sistema miniaturizado de identificação bioquímica de microrganismos, apresentando testes para fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos. Paralelamente, possui substratos ligados a cromogênios e fluorogênios, destinados à detecção de enzimas utilizadas pelos microrganismos para metabolizar determinados substratos. É constituído por tampas dos painéis, onde se encontram substratos desidratados em “pontas de dente” de plástico, bases com 30 poços de reação e um líquido para a preparação do inóculo que encherá os poços da base (Figura 11). Quando a tampa é alinhada com a base

e encaixada, o inóculo de teste reidrata os substratos secos e inicia as reações de teste. Após um período de incubação, é feita a leitura dos painéis em busca de alterações de cor ou da presença de fluorescência, consequentes das atividades metabólicas dos microrganismos. Como nas galerias API®, é formado um número identificador que possibilita a identificação por meio da comparação com uma base de dados (BD, 2004).

Figura 11. Constituintes do sistema comercial para identificação microbiana BBL Crystal®.

Fonte: Adaptada de BD, 2017.

2.3.1.1.2 Sistemas automatizados

O Vitek®2, produzido pela BioMerieux é um sistema de identificação bioquímica mais sofisticado e automatizado que o API® e o BBL Crystal® (Figura 12). Ele contém diferentes cartões de identificação, um para cada tipo particular de microrganismo, contendo de 30 a 45 concavidades com substratos de identificação ou agentes antimicrobianos (Figura 13). Suspensões de células microbianas a serem testadas são preparadas e os cartões são inoculados a vácuo dentro do equipamento e selados. Uma vez que todos os cartões para um ciclo estejam preparados, são colocados na incubadora/leitora, e a análise é iniciada. Periodicamente, o leitor verifica cada cartão, registrando alterações de cor ou produção de gás. Ao fim do tempo de

incubação, os resultados são comparados a uma base de dados de culturas conhecidas, e uma identificação é apontada juntamente com um percentual de probabilidade de acerto. A Figura 14 mostra o fluxo de uma análise de identificação utilizando o sistema Vitek®2 (PINCUS, 2005).

Figura 12. Equipamento e estação de trabalho do Vitek®2.

Fonte: Extraída de CONCERN-ENERGOMASH, 2014.

Figura 13. Cartões de identificação do Vitek®2.

Fonte: Extraída de BIOMERIEUX, 2017a.

Figura 14. Fluxo da análise de identificação pelo Vitek®2.

Fonte: Adaptada de BIOMERIEUX, 2016.

O OmniLog® ID (Biolog, Hayward, USA) também é um sistema automatizado de identificação bioquímica que proporciona resultados rápidos. As bases de dados disponibilizadas para esse sistema permitem a identificação de mais de 2900 espécies de bactérias, leveduras e fungos por meio de um processo de incubação, leitura e interpretação dos resultados de até cinquenta amostras de uma vez, num intervalo de duas horas (Figura 15). A análise é feita em uma microplaca destinada tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas, tornando desnecessários pré-testes e coloração de Gram. Por meio dessa microplaca, é analisada a habilidade da célula bacteriana em metabolizar as principais classes de compostos bioquímicos além de determinar propriedades fisiológicas bacterianas importantes, tais como pH, tolerância ao cloreto de sódio e ao ácido láctico (BIOLOG, 2011).

Figura 15. Sistema automatizado de identificação bioquímica OmniLog® ID (Biolog, Hayward, USA). A: Incubadora e leitora OmniLog e computador com base de dados. B: Interior da incubadora e leitora OmniLog.

Fonte: Adaptada de BIOLOG, 2011.

A análise se restringe ao preparo de um inóculo com densidade celular específica a partir de uma cultura pura, inoculação na microplaca e incubação e leitura no equipamento (OmniLog). Quando as células bacterianas são metabolicamente ativas para as substâncias contidas na microplaca, ocorre a redução de um indicador de pH e uma cor roxa é formada em todos os poços positivos, produzindo um padrão característico, também chamado de “impressão digital metabólica” (Figura 16). Esse padrão metabólico único é registrado e comparado a dezenas de perfis de identificação na base de dados. O sistema permite que os resultados sejam salvos a fim de criar uma base de dados customizada ou rastrear características específicas de determinado microrganismo, assim como sua frequência de isolamento (BIOLOG, 2011; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Figura 16. Microplaca contendo 71 fontes de carbono (açúcares, ácidos carboxílicos, aminoácidos e peptídeos) e 23 ensaios de sensibilidade química (tolerância aos pHs 7, 6 e 5; tolerância às concentrações de cloreto de sódio de 1%, 4% e 8%; tolerância ao ácido láctico; poder de redução; coloração de Gram).

Fonte: Extraída de BIOLOG, 2011.

2.3.1.2 Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos são baseados em ligações antígeno-anticorpo altamente específicas para detectar determinantes celulares únicos de cada microrganismo. A escolha do anticorpo (monoclonal - quando reage com apenas uma determinada parte do antígeno – ou policlonal – quando há uma misturas de diferentes anticorpos que reagem com diferentes porções do antígeno) apropriado é o fator determinante para a performance de tais métodos. Uma vez selecionados, os anticorpos são produzidos em sistemas animais por meio da injeção de um antígeno. Após coleta e purificação, os mesmos podem ser utilizados para detecção dos antígenos correspondentes (FUNG, 2002; JASSON, et al., 2010; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Uma célula inteira de *Salmonella* ou uma porção da mesma, por exemplo, pode ser injetada em um coelho, que produzirá anticorpos contra esse microrganismo ou contra sua porção específica. Ao entrar em contato com uma cultura suspeita de *Salmonella*, a reação positiva de manifestará por meio da aglutinação dos antígenos (*Salmonella*) com os anticorpos (anticorpos contra *Salmonella*). Sendo assim, os métodos de detecção imunológica dependem da expressão única de identificadores específicos que possibilitam a detecção e identificação microbiana (FUNG, 2002).

Há muitas formas de realizar as ligações antígeno-anticorpo. Entre os métodos disponíveis se encontram os que estão fundamentados em fenômenos de aglutinação, em pontos finais colorimétricos ou fluorimétricos. O mais popular é o ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) no formato “sanduíche”. O princípio básico desse método é utilizar uma enzima conjugada a um anticorpo para detectar antígenos por meio do desenvolvimento de coloração após a adição de um substrato cromogênico adequado. Em suma, os anticorpos são fixados a um suporte sólido, como os poços de uma microplaca, onde é colocada uma solução com os antígenos suspeitos. Se esta contiver os antígenos correspondentes aos anticorpos, ocorrerá uma reação de captura. Após lavagem o mesmo tipo de anticorpo, porém conjugado a uma enzima, é adicionado a microplaca e reage com outra porção do antígeno capturado. Após outra etapa de lavagem, um substrato é adicionado, tornando a reação visível devido a mudança de coloração da solução final (Figura 17) (VERMA; SAXENA; BABU, 2013).

Figura 17. Princípio do teste ELISA no formato “sanduíche”.

Fonte: Adaptada de BIOMERIEUX, 2017b.

O sistema VIDAS® (BioMerieux, Hazelwood, Mo., U.S.A.) é uma versão totalmente automatizada do ELISA, capaz de concluir a análise num intervalo de 45 minutos a duas horas, conforme o tipo de microrganismo a ser identificado (Figura 18). Ao analista cabe apenas transferir a suspensão microbiana em teste para a tira reagente, uma vez que todos os reagentes necessários já estão contidos na mesma (Figura 19). O instrumento automaticamente transfere a amostra para um tubo plástico que contém anticorpos aderidos a sua superfície e por meio de uma sucessão de transferências ao longo dos reagentes da tira obtém-se o resultado final (Figura 20) (BIOMERIEUX, 2017b; FUNG, 2002).

Figura 18. Sistema automatizado de identificação microbiana por imunoensaio VIDAS® (BioMérieux, Hazelwood, Mo., U.S.A.).

Fonte: Extraída de BIOMERIEUX, 2017b.

Figura 19. Fluxo de análise pelo sistema VIDAS® (BioMérieux, Hazelwood, Mo., U.S.A.).

Fonte: Adaptada de BIOMERIEUX, 2017b.

Figura 20. Conceito do sistema VIDAS®: tubo recoberto internamente com anticorpos e tira reagente contendo a quantidade necessária de cada reagente para o teste.

Fonte: Adaptada de BIOMERIEUX, 2017b.

2.3.1.3 Perfis de ácido graxo

Os ácidos graxos são componentes lipídicos celulares encontrados em sua maior parte na parede e na membrana celular bacteriana, na forma de glicolipídios, fosfolipídios e como constituintes dos lipopolissacarídeos (Figura 21). A composição de ácidos graxos dos microrganismos é estável, bem conservada e mostra alto grau de homogeneidade dentro de diferentes grupos taxonômicos. Essa especificidade permite a utilização do perfil de ácidos graxos na investigação da identidade microbiana, tendo como base a hipótese de que mudanças nessas estruturas são dirigidas por mudanças na composição dos microrganismos. Assim, os ácidos graxos são comumente utilizados como biomarcadores microbianos, possibilitando a identificação dos microrganismos, por meio de um perfil único para cada espécie (FERNANDES; SAXENA; DICK, 2013; EUROPEAN PHARMACOPOEIA CONVENTION, 2007).

Figura 21. A – Parede celular de uma bactéria Gram positiva; B – Parede celular de uma bactéria Gram negativa.

Fonte: Adaptada de SCIENCE PHOTO LIBRARY, 2017a, 2017b.

A técnica mais comumente utilizada para a análise de perfis de ácidos graxos microbianos é a cromatografia gasosa (CG) de alta resolução. A fim de viabilizar o uso desta técnica analítica, é necessário que esses compostos sejam convertidos em formas mais voláteis, como os estéres metílicos de ácidos graxos, por meio de reações de metilação. Para tanto, os microrganismos isolados são cultivados e incubados em condições altamente padronizadas - uma vez que o perfil de ácidos graxos é influenciado pelas condições de crescimento - e seus ácidos graxos são saponificados, metilados

e extraídos. As condições para a operação da CG também devem ser padronizadas, com corridas frequentes de padrões de calibração e isolados conhecidos. O perfil de ácido graxo de um microrganismo desconhecido é então comparado com uma base de dados de microrganismos conhecidos, para uma possível combinação e identificação (FERNANDES; CHAER, 2010; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Comercialmente, encontra-se disponível o sistema de identificação microbiana Sherlock® (MIDI), composto por um sistema analítico automatizado de CG com autoamostrador, coluna capilar, detector de chama e computador. O equipamento identifica bactérias com base em seu perfil único de ácidos graxos, utilizando ácidos graxos com 9 a 20 carbonos no comprimento da cadeia para a caracterização de gênero e espécie. Conforme o fabricante, o processo de preparo da amostra até a obtenção do resultado final demanda menos de vinte minutos (Figura 22). A análise do conteúdo de ácidos graxos é feita por meio dos dados do tempo de retenção dos picos eluídos da coluna, que são convertidos para valores de comprimento de cadeia equivalente, conforme comparação com tempos de eluição de ácido graxos conhecidos. A composição de ácidos graxos da amostra é comparada à base de dados do sistema, possibilitando a identificação do isolado (MIDI INC., 2017; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Figura 22. Sistema de identificação microbiana rápida Sherlock® (MIDI).

Fonte: Adaptada de MIDI INC., 2017.

2.3.1.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A identificação de microrganismos por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é baseada no fato de que as moléculas dos grupos funcionais microbianos absorvem a radiação infravermelha, gerando um espectro característico de absorção ou transmissão, rico em informação e único (Figura 23). Cada espectro se mostra como uma “impressão digital” do microrganismo analisado, refletindo sua composição bioquímica, ou seja, suas proteínas, lipídios, carboidratos, DNA e RNA. Quando cultivados sobre condições padronizadas, as altas sensibilidade e seletividade do método possibilitam a obtenção de um padrão característico dessas biomoléculas, permitindo a identificação microbiana a nível de cepa por meio da comparação com um banco de dados contendo espectros conhecidos (TAGUE, 2008; VALENTINE et al., 2007).

Figura 23. Espectro no infravermelho por transformada de Fourier de endosporos de três espécies do gênero *Bacillus*: *B. thuringiensis israelensis*, *B. cereus* e *B. megaterium*.

Fonte: Extraída de VALENTINE et al., 2007.

O processo de preparo de amostra é rápido e fácil. Os microrganismos são coletados de um meio de cultura, suspensos em água e então transferidos para uma placa transparente à luz infravermelha (Figura 24). Após a secagem das amostras em dissecador ou sob temperatura moderada (40°C) a fim de evitar a interferência da água no espectro, é feita a análise pelo equipamento.

Como citado anteriormente, é indispensável um protocolo estritamente padronizado de cultivo dos microrganismos, uma vez que o espectro no infravermelho contém informação sobre toda a estrutura química da célula e, portanto também refletirá mudanças na composição celular induzidas por alterações nas condições de cultivo, tais como o tipo de meio, temperatura e tempo de incubação. A manutenção das configurações dos parâmetros utilizados para a aquisição do espectro também é importante para a obtenção de resultados confiáveis (WENNING; SCHERER, 2013).

Figura 24. Processo de preparo de amostra para análise por FTIR.

Fonte: Adaptada de TAGUE, 2008.

A análise por FTIR pode ser realizada nos equipamentos disponíveis no mercado (EUROPEAN PHARMACOPOEIA CONVENTION, 2007). Um amostrador desenhado para abrigar uma microplaca com 96 poços, como o X, Y Autosampler da PIKE Technologies, é um acessório compatível com a maior parte dos sistemas de FTIR, que traz vantagens para laboratórios com alta demanda de identificação microbiana, como ocorre, em muitos casos, com laboratórios farmacêuticos de controle de qualidade (PIKE TECHNOLOGIES, 2014). Dentre os espectrômetros de FTIR disponíveis comercialmente, pode-se citar o FTIR Spectrum One da Perkin-Elmer e o Nicolet IR200 FTIR da Thermo Electron Inc.

2.3.1.5 Espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF

Uma das técnicas que desperta elevado interesse dentre aquelas disponíveis para métodos rápidos e automatizados é a MALDI-TOF MS. Embora a espectrometria de massas tenha sido originalmente desenvolvida para a identificação de moléculas de baixo peso molecular em misturas complexas, atualmente é possível realizar também por meio dela a caracterização de misturas complexas de macromoléculas biológicas. Com o surgimento da tecnologia MALDI-TOF tornou-se possível ainda a geração de “impressões digitais moleculares” de microrganismos inteiros por meio da análise direta de fungos e bactérias. Esse atributo somado aos reagentes de baixo custo e a capacidade de fornecer o resultado de identificação microbiana em um período curto de tempo fazem da MALDI-TOF MS uma opção atrativa para os laboratórios microbiológicos (BUCHAN; LEDEBOER, 2014; VAN BELKUM, 2007; WIESER et al., 2012).

O uso dessa técnica em microbiologia tem se mostrado confiável e exata. Vários estudos têm demonstrado sua exatidão na identificação de bactérias e leveduras. Chao e colaboradores (2014) e Jamal e colaboradores (2014) avaliaram a exatidão de identificação de leveduras de dois sistemas de MALDI-TOF MS disponíveis comercialmente, em comparação com métodos convencionais. Ambos os trabalhos apontaram a técnica como uma alternativa promissora para a identificação destes microrganismos (CHAO et al., 2014; JAMAL et al., 2014).

Charnot-Katsikas e colaboradores (2014) avaliaram a exatidão de identificação de fungos e bactérias de um sistema de MALDI-TOF MS disponível comercialmente, em comparação com método bioquímico. Observou-se que a exatidão do primeiro foi comparável ou superior a do segundo, podendo aquele ser efetivamente incorporado a rotina laboratorial (CHARNOT-KATSIKAS et al., 2014). Martiny e colaboradores (2012) também avaliaram a eficiência da técnica para identificação bacteriana e obtiveram resultados equivalentes aos alcançados pelos estudos citados acima (MARTINY et al., 2012).

A identificação microbiana por MALDI-TOF MS é alcançada por meio da obtenção de espectros característicos de determinadas espécies, gêneros, ou

famílias de microrganismos (DARE, 2005). Esses espectros são formados pela produção de íons a partir da amostra e sua subsequente separação e detecção, de acordo com a relação entre a massa e a carga de cada um deles. Os principais componentes de um espectrômetro de massas típico são: fonte de ionização, onde as amostras são convertidas em íons e transferidas para a fase gasosa; analisador de massas, que pode separar os íons pelo uso de campos magnéticos ou elétricos e, alternativamente, pelo tempo de voo, ou seja, pelo tempo gasto por íons de diferentes massas para migrar distâncias definidas; e um detector (WILSON; WALKER, 2010).

Existem vários tipos de fontes de ionização e analisadores de massas disponíveis atualmente. Para a identificação microbiana, são utilizadas fontes que promovem ionização branda, como a ionização por electrospray (ESI, do inglês, *electrospray ionization*) e a ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization*). A interface mais comum é entre a fonte de ionização MALDI e o analisador de massas por tempo de voo (TOF, do inglês, *time-of-flight*). Nessa combinação, a fonte MALDI produz íons protonados em fase gasosa por meio da excitação da amostra, que recebe energia proveniente de uma solução matriz capaz de absorver energia de um feixe de laser. Os íons formados são submetidos a uma diferença de potencial fixa (tipicamente de 20 a 30 kV) que os acelera pelo analisador de massas, onde a separação ocorre. Uma vez que todos os íons têm a mesma energia cinética, os que possuem maior massa viajarão com uma velocidade mais baixa pelo tubo do analisador do que aqueles com massas menores, atingindo o detector posteriormente (Figura 25) (KICMAN; PARKIN; ILES, 2007).

Figura 25. Analisador de massas TOF.

Fonte: Adaptada de KICMAN; PARKIN; ILES, 2007.

Numa análise de identificação por MALDI-TOF MS, as células microbianas são tomadas diretamente do meio de cultura e transferidas para uma placa de metal específica para a tecnologia MALDI. Em seguida, as células são recobertas com aproximadamente 1 μL de uma solução saturada de um composto orgânico de baixo peso molecular, chamada solução matriz, que irá auxiliar no processo de ionização. Após secagem, a amostra e a solução matriz cocristalizam e formam um depósito sólido. Esse cristal amostra-matriz é então atingido por um feixe de laser (337 nm) por um curto período de tempo, a fim de evitar danos ou degradação a amostra pelo excesso de calor (Figura 26). As moléculas da matriz absorvem energia do laser e sublimam para a fase gasosa, ocorrendo em seguida a ionização da amostra (Figura 27) (CLARK et al., 2013).

Figura 26. Esquema geral de identificação de microrganismos inteiros por MALDI-TOF MS.

Fonte: Adaptada de CLARK et al., 2013.

Figura 27. Ionização de analitos por MALDI. O cocrystal de matriz e amostra é atingido pelo laser, causando dessorção seguida de desolvatação e então introdução no analisador de massas.

Fonte: Adaptada de KICMAN; PARKIN; ILES, 2007.

O espectro de massas formado é uma medida dos íons de superfície das células microbianas analisadas. Esses componentes de superfície estão associados com a fisiologia microbiana, virulência e patogenicidade, definindo as características dos microrganismos e, consequentemente, sua identidade.

Assim, a comparação de espectros obtidos de microrganismos de referência com os de microrganismos desconhecidos possibilita a identificação (DARE, 2005). Proteínas ribossomais também podem ser registradas no espectro e estão envolvidas no processo de identificação. Uma vez as composições proteicas variam entre espécies, cepas e subespécies microbianas, diferentes espectros serão gerados, permitindo a discriminação entre microrganismos estreitamente relacionados (CLARK et al., 2013).

O pré-requisito essencial para identificação microbiana acurada é a inclusão de dados de referência confiáveis no banco de dados. No caso da tecnologia MALDI-TOF MS, os dados de referência podem ser espectros individuais, espectros obtidos por meio de repetidas análises de um mesmo isolado ou espectros obtidos por meio da análise de múltiplos isolados específicos. Na área clínica, o banco de dados deve conter espectros de referência de todos os microrganismos patogênicos relevantes, assim como das espécies intimamente relacionadas, e são esses os que estão disponíveis comercialmente em grande parte. Na área farmacêutica, é essencial dispor de bancos de dados aprimorados e da flexibilidade dos mesmos em permitir a inclusão de cepas ambientais frequentemente isoladas nas áreas limpas (WELKER; MOORE, 2011).

A falta de exatidão e reprodutibilidade da técnica pode ser consequência da utilização de uma base de dados inadequada para o campo particular de aplicação. Uma vez que algumas espécies apresentam grande variabilidade entre as cepas que as compõem, é essencial o emprego de uma base de dados com potencial para atender aos casos de grande variação intra-espécie, principalmente quando se trata da identificação de microrganismos imprevisíveis, como os isolados ambientais. Assim, foi criada uma ferramenta computacional para auxiliar nesses casos, denominada SuperSpectra (VELOO et al., 2010). Por meio dela, é feita uma comparação mais completa entre o espectro de referência e o do isolado desconhecido. Isso porque um SuperSpectra é a combinação de espectros de referência de múltiplas cepas ou clones de uma dada espécie para, primeiramente, identificar sinais estáveis de massa e também encontrar padrões de sinal de massa espécie-específicos (WELKER; MOORE, 2011).

O sistema Vitek® MS, fabricado pela bioMérieux, é um dos comercialmente disponíveis para a rápida identificação de microrganismos empregando a tecnologia MALDI-TOF (Figura 28). Possui a capacidade de análise de 192 amostras numa única corrida, em aproximadamente 4 horas, e seu banco de dados é construído a partir de uma média de mais do que 10 isolados por espécie e de 25 espectros por espécie, além de considerar a diversidade geográfica dos isolados, diferentes origens de amostra, repicadas em diferentes meios de cultura e tempos de incubação diversos. Esses aspectos são essenciais para uma análise confiável, uma vez que a composição celular sofre variações quando exposta a diferentes condições de cultivo. Para a análise de isolados ambientais, essas questões se tornam ainda mais importantes, quando se considera as condições drásticas a que os microrganismos são expostos num ambiente de sala limpa (BIOMERIEUX, 2017c).

Figura 28. Sistema de identificação microbiana por espectrometria de massas Vitek® MS (bioMérieux, Hazelwood, Mo., USA).

Fonte: BIOMERIEUX, 2017c.

2.3.2 Validação de métodos microbiológicos rápidos

Tendo em vista as vantagens que acompanham a adoção de métodos microbiológicos rápidos pelos laboratórios de controle de qualidade, uma das principais razões para a lentidão na implementação dos mesmos é a posição

conservadora tomada tanto pelas agências regulatórias quanto pelas empresas farmacêuticas. Afinal, a maioria dos métodos microbiológicos utilizados hoje em dia estão em uso há quase um século, resultando em técnicas bem estabelecidas, de simples execução e não dispendiosas. No entanto, devido a evolução dos novos métodos e as iniciativas já descritas anteriormente neste trabalho, um novo panorama pode ser encontrado em algumas regiões, como Estados Unidos, Europa, Japão, Austrália e Brasil, onde as autoridades regulatórias tem compreendido de forma mais ampla, aceitado e até encorajado o uso de métodos microbiológicos alternativos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015; PDA, 2013).

Nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) não apenas tem aceito os métodos microbiológicos rápidos há alguns anos, como também criou guias relacionados ao assunto, por exemplo, o *FDA Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice*, publicado em 2004, que recomenda o uso de um método rápido genotípico para identificação microbiana devido a maior exatidão em comparação com os métodos bioquímicos e fenotípicos. Esta agência regulatória também sugere às indústrias farmacêuticas que a USP <1223>, a Ph. Eur. capítulo 5.1.6 ou o TR33 sejam usados como base para o desenvolvimento de um plano de validação adequado. Adicionalmente, muitas empresas têm utilizado com sucesso o Protocolo de Comparabilidade do FDA (CP), um plano de validação previamente aprovado que pode ser utilizado para a implementação dos métodos alternativos (PDA, 2013).

Na Europa, a *European Medicines Agency* (EMA) também apoia a validação e implementação dos métodos microbiológicos rápidos, porém com sutis diferenças em relação ao FDA quanto aos requisitos que devem ser submetidos para a avaliação regulatória. Em 2010, entrou em vigor um regulamento (*Commission Regulation – EC 1234/2008*) que trouxe alterações positivas para a validação e implementação dos métodos rápidos. Uma das mais significativas foi a oportunidade de dialogar cientificamente com as autoridades regulatórias por meio do *EMA Scientific Advice*, onde a empresa pode solicitar auxílio nas suas estratégias de validação e implementação dos novos métodos e receber um relatório escrito com o parecer. Com base nesse mesmo regulamento, foi publicado um guia que implementa o *post approval*

change management protocol (PACMP), uma iniciativa semelhante à do CP, que provê uma estratégia de administrar as revisões dos planos de validação pelo EMA antes do início dos testes (PDA, 2013).

As agências regulatórias japonesa (*Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* – PMDA) e australiana (*Australian Therapeutic Goods Administration* – TGA) também são receptivas aos métodos microbiológicos rápidos. A TGA australiana utiliza algumas sessões da Ph. Eur., *British Pharmacopoeia*, USP capítulo <1223>, ISO 17025 e o TR33 como base para avaliar a validação e implementação dos novos métodos. Já a PMDA japonesa apenas avalia e concede aprovação de métodos rápidos empregados para análise de produto final, por exemplo, um teste rápido de esterilidade. Quanto aos testes utilizados para controle em processo, a validação e implementação dos mesmos são de inteira responsabilidade dos produtores. Na última edição da *Japanese Pharmacopoeia* (JP17), publicada em março de 2016, há um trecho que trata brevemente sobre a validação de métodos rápidos (PDA, 2013; THE JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2011).

No Brasil, o cenário regulatório também é propício para a implementação dos métodos microbiológicos rápidos pelos laboratórios farmacêuticos. Os primeiros passos foram dados em julho de 2014, quando a ANVISA publicou a abertura de consulta pública para a proposta de Método Geral da Farmacopeia Brasileira – Métodos Microbiológicos Alternativos, como foi citado anteriormente (ASCOM, 2014). Em fevereiro de 2016, foi aprovado, por meio da RDC nº 59 publicada no Diário Oficial da União, o Primeiro Suplemento da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FB5), com uma grande parte dedicada a descrição dos métodos microbiológicos alternativos e as orientações para validação dos mesmos, assim como suas aplicações.

Os guias disponíveis para eleger e validar métodos microbiológicos rápidos são, principalmente, a USP, a Ph. Eur. e o TR33. Entretanto, em regiões que não são norte-americanas nem europeias, podem também ser utilizadas as farmacopeias locais, como a FB5. Na revisão mais recente do TR33, publicada em 2013, foi levada em consideração para a validação de métodos microbiológicos rápidos as recomendações da USP, da Ph. Eur. e da primeira versão do TR33, além das práticas atuais da indústria e das expectativas regulatórias. Dessa forma, este tem sido um dos principais guias

utilizados pela indústria farmacêutica e por pesquisadores da área de microbiologia farmacêutica para a validação dos novos métodos.

2.3.3 Expectativas regulatórias

As agências regulatórias, na maior parte dos casos, aceitarão uma mudança de método clássico para método rápido se este se provar equivalente, superior e/ou não inferior ao primeiro. Entretanto, em cada caso, é de grande importância ter um diálogo aberto entre as partes interessadas (i.e., a indústria que pretende implementar o método rápido e a agência regulatória competente) e um amplo entendimento das expectativas regulatórias da agência em questão, uma vez que cabe a ela a decisão final de aceitação ou não do novo método. Esse diálogo pode incluir aspectos sobre o método proposto, produtos impactados, a abordagem da validação e os critérios de aceitação. Encontros desse tipo têm sido muito úteis para ambas as partes, garantindo que a aprovação regulatória será obtida com sucesso, quando solicitada (PDA, 2013).

A USP 38 estabelece que o critério mais apropriado para a validação de um método microbiológico alternativo é “pelo menos equivalente ao método compendial”, dada a natureza comparativa da questão. Dessa forma, é evidenciado que o ponto crítico é verificar se o método alternativo proporcionará resultados equivalentes ou superiores aos resultados gerados pelo método convencional. De acordo com esse compêndio, a adequabilidade de um novo método deve ser demonstrada em um estudo comparativo entre o método compendial e o método alternativo por meio de determinados parâmetros de validação, que serão apresentados mais à frente (USP, 2015).

A Ph. Eur. segue a mesma linha da USP 38 estabelecendo que “o valor de um método novo deve ser demonstrado em um estudo comparativo entre o método oficial e o método alternativo”, conforme parâmetros de validação predeterminados. No entanto, não há clareza quanto ao critério adotado para avaliar o método novo frente ao convencional, se equivalente, superior e/ou não inferior. Com a leitura do capítulo, deduz-se que, assim como indicado pela USP 38, o método alternativo deve proporcionar resultados equivalentes ou

superiores aos resultados gerados pelo método convencional (EUROPEAN PHARMACOPOEIA CONVENTION, 2007).

A JP17 aborda a validação de forma sucinta, entretanto sua expectativa quanto aos resultados obtidos é clara: “quando uma cepa padrão for utilizada, o resultado da validação deve ser equivalente ou superior ao método convencional”. Entretanto, é reconhecida a limitação que pode afetar esse critério, uma vez que os princípios de detecção dos novos métodos geralmente diferem daqueles sobre os quais se baseiam os métodos convencionais. Assim, é assegurado que a correlação entre os métodos nem sempre é requerida (THE JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2011).

A FB5 apresenta como objetivo da validação a demonstração da não inferioridade entre o método microbiológico alternativo e o método convencional. Isso porque por meio desse atributo é possível “demonstrar que o método alternativo não é menos sensível e é tão eficaz quanto o método tradicional”. Para tanto, deve ser considerada uma margem de tolerância fixada previamente, denominada margem de não inferioridade (M). Orientações sobre os cálculos que devem ser utilizados na validação também são colocadas no texto, indicando que a não inferioridade deve ser estabelecida a partir de intervalos de confiança bilaterais (IC 95%) ou unilaterais (IC 97,5%), nos quais o limite superior para a diferença entre os métodos (tradicional – alternativo) é menor que a margem M. Os parâmetros que devem ser utilizados para a demonstração da não inferioridade também são determinados, conforme o tipo de teste microbiológico (BRASIL, 2010b).

2.3.4 Parâmetros de validação para métodos alternativos de identificação microbiana

Os guias para validação de métodos microbiológicos rápidos definem características que devem ser avaliadas nos novos métodos para determinar se esses são adequados para o uso pretendido. Tais características são denominadas parâmetros ou critérios de validação. Alguns deles são oriundos da validação de métodos analíticos para ensaios químicos, uma vez que nessa área os parâmetros seguidos já são bem estabelecidos. Porém, para aplicação na validação de métodos microbiológicos rápidos para identificação microbiana,

apenas dois são levados em consideração: exatidão e reprodutibilidade (PDA, 2013).

A USP 38 estabelece que, quando se trata de métodos de identificação microbiana, a melhor forma de atestar o uso de um método alternativo em detrimento de um método oficial é por meio de uma verificação que inclui uma das seguintes avaliações:

- usar um sistema existente para teste paralelo de isolados microbianos obtidos a partir da rotina (o número de isolados testados pode ser tão alto quanto 50 e qualquer discrepância na identificação deve ser resolvida utilizando-se um método de referência);
- testar de 12-15 culturas estoque conhecidas representativas de diferentes espécies comumente isoladas para um total de 50 testes;
- confirmar que as identificações de 20-50 microrganismos, incluindo de 15-20 diferentes espécies, concordam com os resultados de um laboratório de referência para as mesmas amostras (USP, 2015).

Por meio desses testes, a exatidão ($\text{número de resultados corretos} \div \text{número total de resultados}$) e a reprodutibilidade ($\text{número de resultados corretos concordantes entre os dois métodos} \div \text{número total de resultados}$) podem ser avaliadas. Cabe ao usuário estabelecer um critério de aceitação adequado para sua análise de verificação, considerando a capacidade do método. No entanto, tipicamente, uma concordância acima de 90% pode ser atingida com amostras de microrganismos apropriados para os métodos submetidos aos testes (USP, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a adequabilidade da técnica de espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF para a identificação de rotina de microrganismos presentes em áreas limpas, tanto no ar e superfícies quanto nas luvas e roupas dos operadores no processo de fabricação de uma vacina viral.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar método rápido empregando a técnica de espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF comparativamente com método convencional utilizado para identificação dos microrganismos nas áreas limpas estudadas que emprega um sistema automatizado de identificação bioquímica (BBL Crystal®);
- Realizar o mapeamento geral dos microrganismos presentes nas áreas limpas estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

O material de estudo do presente trabalho consistiu de partículas viáveis (microrganismos) amostradas do ar e das superfícies de áreas limpas (classificadas em graus A, B, C e D) destinadas a produção dos monovalentes de uma vacina viral, assim como aquelas isoladas em luvas e roupas dos operadores destas áreas.

4.2 Método

Foram estudadas 13 salas limpas pertencentes a uma indústria farmacêutica brasileira produtora de imunobiológicos. Durante o período considerado nesse estudo, ou seja, de outubro de 2014 a setembro de 2016, essas salas estavam destinadas, especificamente, a produção de monovalentes de uma vacina viral. Seus esboços podem ser encontrados nos Apêndices A-L. Uma vez que a referida produção é realizada em esquema de campanha, o período anteriormente mencionado englobou as atividades produtivas realizadas durante duas campanhas: a primeira de outubro de 2014 a setembro de 2015 e a segunda de outubro de 2015 a setembro de 2016.

As vacinas virais são produzidas a partir de partículas ou moléculas de vírus capazes de deflagrar a produção de anticorpos específicos, denominadas antígenos. Conforme o propósito da vacina, os antígenos podem ser utilizados individualmente, quando são denominadas monovalentes, ou em combinação, quando são denominadas bivalentes, trivalentes ou tetravalentes, conforme a quantidade de variantes de vírus presente na formulação. A vacina considerada neste trabalho é composta por três variantes virais (trivalente), sendo cada antígeno produzido separadamente por meio do cultivo dos vírus na cavidade alantóica de ovos embrionados destinados, exclusivamente, a produção de vacinas. Geralmente, uma dose de vacina corresponde a um ovo.

Após a inoculação automática do vírus nos ovos embrionados seguida por um período de incubação, onde ocorre a replicação do mesmo, os ovos são colocados em uma câmara fria a fim de que ocorra a morte do embrião, a retração dos vasos sanguíneos e a liberação do vírus no líquido alantóico. É

feita então a colheita deste líquido por meio de corte e inversão dos ovos. O material colhido é filtrado e levado para centrifugação, onde ocorre o processo de clarificação para a retirada de restos de membrana, de cascas de ovos e hemácias. Ao final dessa fase, o material está concentrado e é levado para a purificação, sendo posteriormente diluído e submetido a ação de um detergente, para que ocorra a fragmentação do vírus.

A suspensão viral fragmentada é então inativada com formaldeído para tornar o vírus incapaz de se replicar e causar doença. O produto inativado passa por um processo de filtração esterilizante e, em seguida, é feita uma amostragem para verificar a qualidade da vacina monovalente. As salas limpas que dão lugar as etapas descritas até aqui foram as consideradas para a coleta dos dados. A etapa de produção subsequente é a de formulação, onde são misturados os três tipos de monovalente e outras substâncias, para que a vacina fique com a composição e diluição final. Por fim, a vacina formulada segue para a fase do envase, controle de qualidade, rotulagem e embalagem.

A Figura 29 mostra o fluxo de produção dos monovalentes e as respectivas salas limpas em que cada operação ocorre.

Figura 29. Fluxo de produção dos monovalentes da vacina viral.

Fonte: Próprio autor.

As salas que não constam na Figura 29 possuem função auxiliar, conforme descrito abaixo:

- Sala 3 – Almoxarifado de material estéril, preparo de material, descontaminação e box de lavagem.
- Sala 4 – Box de lavagem e descarte.
- Sala 5 – Preparo de inóculo
- Sala 9 – Preparo de soluções
- Sala 10 – Preparo de material estéril e lavagem
- Sala 12 – Preparo de soluções
- Sala 13 – Pesagem.

Os dados obtidos foram oriundos do Programa de Monitoramento Ambiental realizado, rotineiramente, nas referidas salas durante a produção dos monovalentes. Assim, os planos de amostragem, contendo os tipos de amostra, locais de amostragem com seus devidos graus de classificação, técnicas de amostragem, limites de ação e alerta e frequência do monitoramento dos microrganismos em cada sala, assim como todos os meios de cultura e condições de incubação adotados nesse trabalho foram determinados pelo fabricante da vacina viral, conforme estabelecido por compêndios oficiais, como a USP 38, e pela legislação vigente, RDC nº17/2010.

Conforme pode ser observado nos Apêndices A-L, a cada uma das salas foram atribuídos graus de limpeza e determinados pontos de coleta das partículas viáveis, com base numa análise de risco feita previamente pelo Setor de Controle de Qualidade de acordo com o tipo de atividade realizada nas áreas dentro das salas. O sistema de classificação utilizado foi o estabelecido pela RDC nº17/2010. As salas limpas eram compostas por áreas classificadas, totalizando

- 11 áreas classificadas grau D;
- 8 áreas classificadas grau C;
- 1 área classificada grau B;
- 1 área classificada grau A.

A Figura 30 resume e esquematiza as etapas do Programa de Monitoramento Ambiental com vistas a identificação microbiana, para fins de

entendimento dos métodos de amostragem, quantificação e identificação microbiana empregados neste trabalho, que estão descritos na sequência.

Figura 30. Fluxograma do Programa de Monitoramento Ambiental com vistas a identificação microbiana.

Fonte: Próprio autor.

4.2.1 Amostragem e quantificação das partículas viáveis

O monitoramento ambiental das áreas estudadas seguiu o plano de amostragem estabelecido nos Apêndices A-L. A frequência de amostragem foi realizada conforme descrito no Quadro 5, sendo que todos os pontos foram monitorados preferencialmente “em operação”. Quando a área não estava “em operação”, realizou-se o monitoramento “em repouso”, e neste caso não foram amostrados os pontos selecionados para a amostragem de sedimentação, que visam acompanhamento do processo.

Quadro 5. Frequência de monitoramento de partículas viáveis do ar e de superfícies nas salas limpas.

Classe da Área Limpa	Estado “Em Operação”	Estado “Em Repouso”
Grau A*	Por lote produzido	Semanalmente
Grau B**	Diariamente	Semanalmente
Grau C***	Semanalmente	Semanalmente
Grau D***	Mensalmente	Mensalmente

Fonte: Próprio autor.

Notas:

* Grau A: zonas de alto risco operacional, como envase e conexões assépticas.

** Grau B: áreas circundantes às de grau A para preparações e envase assépticos.

*** Graus C e D: áreas onde são realizadas etapas menos críticas na produção asséptica.

Apenas os operadores que executaram atividades em áreas de graus A e B, inclusive os colaboradores responsáveis pela amostragem do

monitoramento ambiental, foram monitorados, conforme a frequência estabelecida no Quadro 6. Os operadores de áreas de filtração que efetuam conexões críticas (conexões assépticas do sistema de filtração esterilizante) tiveram suas luvas amostradas após o fim desta etapa, a cada lote produzido. Posteriormente ao monitoramento de luvas, os operadores realizavam a troca destas. Nos demais operadores, o monitoramento de luvas foi realizado após o término do processo, no momento em que deixavam as salas limpas.

Quadro 6. Frequência de monitoramento de partículas viáveis nos operadores.

Pontos de Monitoramento	Frequência
Luvas	Por lote produzido
Uniforme – Parcial*	Por lote produzido
Uniforme – Completo**	Mensalmente***

Fonte: Próprio autor.

Notas:

* Uniforme parcial: peito, braços direito e esquerdo, testa.

** Uniforme completo: peito, braços direito e esquerdo, testa, nuca, coxas direita e esquerda, pernas direita e esquerda (atrás).

*** O monitoramento realizado uma vez ao mês, em dia aleatório, dos funcionários que estavam envolvidos no processo.

Os dados obtidos foram avaliados considerando os limites para as áreas Graus A, B, C e D (Quadro 7), sendo os de alerta e de ação estabelecidos pelo fabricante da vacina e a especificação dada pela RDC nº17/2010. Nos casos em que foram encontrados resultados iguais ou superiores ao limite de alerta, realizou-se a identificação dos microrganismos.

Quadro 7. Limites de contaminação microbiana conforme a classificação da área limpa e a técnica de amostragem.

Classificação da Área Limpa	Técnica de Amostragem	Limite de Alerta (Definido pelo fabricante)	Limite de Ação (Definido pelo fabricante)	Especificação (RDC nº17/2010)
Grau A	Placas de contato	NA	NA	< 1,0 UFC/placa
	<i>Swab</i>	NA	NA	< 1,0 UFC/swab
	Amostragem ativa	NA	NA	< 1,0 UFC/m ³
	Amostragem passiva	NA	NA	< 1,0 UFC/placa
Grau B	Placas de contato	3,0 UFC/placa	4,0 – 5,0 UFC/placa	≤ 5,0 UFC/placa
	<i>Swab</i>	3,0 UFC/swab	4,0 – 5,0 UFC/swab	≤ 5,0 UFC/swab
	Amostragem ativa	5,0 – 6,0 UFC/m ³	7,0 – 10,0 UFC/m ³	≤ 10,0 UFC/m ³
	Amostragem passiva	3,0 UFC/placa	4,0 – 5,0 UFC/placa	≤ 5,0 UFC/placa
Grau C	Placas de contato	13,0 – 17,0 UFC/placa	18,0 – 25,0 UFC/placa	≤ 25,0 UFC/placa
	<i>Swab</i>	NA	NA	NA
	Amostragem ativa	50,0 – 69,0 UFC/m ³	70,0 – 100,0 UFC/m ³	≤ 100,0 UFC/m ³
	Amostragem passiva	25,0 – 34,0 UFC/placa	35,0 – 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Grau D	Placas de contato	25,0 – 34,0 UFC/placa	35,0 – 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
	<i>Swab</i>	NA	NA	NA
	Amostragem ativa	100,0 – 139,0 UFC/m ³	140,0 – 200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
	Amostragem passiva	50,0 – 69,0 UFC/placa	70,0 – 100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa

Fonte: Fabricante da vacina viral.

Notas:

NA = Não se aplica.

UFC = Unidade Formadora de Colônia.

4.2.1.1 Amostragem de ar para determinação de partículas viáveis

Foram utilizados dois métodos de amostragem de ar para determinação de partículas viáveis: o método passivo e o método ativo.

A amostragem ativa do ar foi realizada empregando o amostrador de ar M Air T®(Merck – Millipore), seguindo o princípio da impactação, e placas de Petri estéreis, adaptáveis ao equipamento, contendo meio de cultura Ágar Caseína Soja, adquiridas comercialmente. Cada lote de placa utilizada foi previamente submetido aos testes de capacidade promotora de crescimento e esterilidade e aprovado para o uso. Após as amostragens de 1,0 m³ (1000 L)

de ar durante um tempo de exposição de 15 minutos, as placas foram retiradas do equipamento, revestidas com Parafilm® e levadas para serem incubadas em posição invertida em estufa bacteriológica a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 48h, e na sequência a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 72h, totalizando 120h de incubação. Em seguida foi realizada a contagem das UFCs.

A amostragem passiva do ar foi realizada por meio de método que emprega placas de sedimentação. Para isso, unidades estéreis de placas de Petri 90 x 15 mm contendo Ágar Caseína Soja, embaladas hermeticamente em dupla embalagem, foram adquiridas comercialmente e aprovadas para o uso nos testes de capacidade promotora de crescimento e esterilidade. Respeitando procedimentos específicos, estas placas foram transportadas para as áreas sob monitoração. Nos locais definidos para exposição, foram removidas as tampas e depositadas as placas por um período de 4 horas. Após este tempo, as placas foram tampadas, revestidas com Parafilm® e levadas para serem incubadas em posição invertida nas condições descritas acima, procedendo-se à contagem das UFCs.

4.2.1.2 Amostragem de superfícies, luvas e roupas

A amostragem de partículas viáveis de superfícies e das roupas dos operadores foi realizada empregando placas de contato (Rodac®) estéreis contendo Ágar Caseína Soja adquiridas comercialmente (BRASIL, 2010b). Cada lote de placa utilizada foi previamente submetido aos testes de capacidade promotora de crescimento e esterilidade e aprovado para o uso. Após transportadas para as áreas onde se encontravam as superfícies a serem monitoradas, a superfície do meio contido nas placas se manteve em contato com a superfície a ser amostrada por um período de aproximadamente 5 segundos, sob leve pressão.

As luvas dos operadores foram amostradas com placas de Petri 90 x 15 mm contendo Ágar Caseína Soja adquiridas comercialmente já estéreis, por meio do toque dos dez dedos das mãos no meio de cultura (BRASIL, 2010b). Estas também foram submetidas e aprovadas para o uso nos testes de capacidade promotora de crescimento e esterilidade.

As superfícies não planas, como maçanetas de portas, foram amostradas com “swabs” de algodão (BRASIL, 2010b). Cada um deles foi logo

em seguida transferido para tubo contendo 10 mL de solução tampão pH 7,2. Os tubos foram agitados em vortex e foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada amostra. Este conteúdo líquido foi vertido em placa de Petri vazia, onde foi adicionado aproximadamente 20 mL do meio de cultura Ágar Caseína Soja adquirido comercialmente e aprovado para o uso nos testes de capacidade promotora de crescimento e esterilidade, previamente fundido e resfriado a temperatura de aproximadamente 45°C. As placas ficaram em repouso até solidificação do Agar.

Após as amostragens de superfícies, luvas e roupas, as placas utilizadas foram revestidas com Parafilm® e levadas para serem incubadas em posição invertida nas condições descritas acima, procedendo-se à contagem das UFCs.

4.2.2 Identificação dos microrganismos isolados nas áreas limpas estudadas

A identificação dos microrganismos isolados a partir da amostragem ativa e passiva de ar, assim como da amostragem de superfícies, luvas e roupas foi efetuada empregando-se o método microbiológico rápido de espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF, por meio do equipamento Vitek® MS.

Após contagem das UFCs, foi feita a identificação das colônias presentes nas placas que apresentaram contagem microbiana superior ao limite de alerta. Primeiramente, o dispositivo específico do equipamento (*slide* Flexi-mass™ – Shimadzu Biotech®) e as colônias foram registrados no *software* do mesmo e em seguida estas foram transferidas para o *slide*, por meio de uma alça estéril de 10 µL. Colônias de *Escherichia coli* (Bioball® referência NCTC 12923, equivalente a cepa ATCC 8739) cultivadas em ágar MacConkey também foram transferidas, como controle positivo. Adicionou-se 1 µL de solução matriz CHCA (alfa-ciano-4-hidroxicinâmico) em cada orifício (*spot*) do *slide* e, após secagem, adicionou-se também 1 µL de ácido fórmico. Ao término deste processo de preparo de amostra, com todos os orifícios já secos, o dispositivo foi colocado no equipamento e seguiu-se o comando do teste em conformidade com a orientação do fabricante.

Os reagentes foram adquiridos na forma de um kit, comercializado pelo fabricante do equipamento, para uso específico no sistema de identificação

Vitek® MS. Os *slides* também foram adquiridos do fabricante. Cada um é dividido em três sessões de 16 *spots* com um *spot* central para o controle positivo, possibilitando a leitura de 48 amostras por *slide*. Uma vez que o equipamento possui capacidade para abrigar 4 *slides*, foi possível analisar 192 amostras de uma só vez, em um período de aproximadamente 4 horas.

O equipamento Vitek® MS foi utilizado conjuntamente com dois computadores, e um leitor de código de barras para identificação do *slide*. Em um dos computadores foi instalado o sistema Shimadzu Biotech MALDI-MS, para comando e visualização do teste em andamento, e no outro, o programa Saramis Target Manager e o sistema Saramis Premium, para interpretação dos espectros obtidos.

4.2.3 Verificação do método microbiológico alternativo

O guia utilizado para a verificação do método microbiológico alternativo foi a USP 39. No capítulo <1113> *Microbial Characterization, Identification, and Strain Typing* são descritas três formas pelas quais é possível realizar a verificação de um sistema de identificação microbiana. A opção escolhida para este estudo foi a que orienta o teste de 12-15 culturas estoque conhecidas representativas de diferentes espécies comumente isoladas para um total de 50 testes. Devido a necessidade de adequação às condições experimentais, foram testadas 18 culturas estoque conhecidas representativas de diferentes espécies comumente isoladas para um total de 54 testes.

Portanto, foram selecionadas 18 espécies bacterianas entre aquelas recomendadas pela USP 39 e as recorrentes nas salas limpas (Tabela 2), conforme a orientação desse compêndio. Cada uma delas foi testada em triplicata em ambos os métodos, totalizando 54 testes com o método alternativo e 54 testes com o método convencional. Foi utilizado o método convencional BBL Crystal® paralelamente ao método alternativo por espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF. O parâmetro avaliado no teste de verificação foi a exatidão dos métodos.

Tabela 2. Bactérias selecionadas para o estudo.

Bactéria	Cepa ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Bacillus spizizenii</i>	6633
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027
<i>Escherichia coli</i>	8739
Bactérias isoladas das salas limpas estudadas	
Gram positivas	Gram negativas
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Delftia acidovorans</i>
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Ralstonia panila</i>
<i>Bacillus cereus</i> group	-

Fonte: Próprio autor.

Nota: As culturas estoque das espécies bacterianas selecionadas para o estudo foram identificadas pelo método de espectrometria de massas baseada na tecnologia MALDI-TOF.

4.2.3.1 Recuperação e identificação das bactérias ambientais e preparo das culturas estoque

As espécies bacterianas recorrentes nas salas limpas foram recuperadas das placas de amostragem para determinação de partículas viáveis, após incubação aeróbia das mesmas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e, seguidamente, a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 72h, totalizando 120h de incubação. A identificação das UFCs foi realizada por MALDI-TOF MS, conforme método descrito anteriormente, em duplicata.

Culturas estoque foram preparadas por meio da transferência das colônias para placas de Petri 90 x 15 mm estéreis contendo meio de cultura Ágar Caseína Soja, adquiridas comercialmente, com o auxílio de uma alça estéril de 10 µL. Em seguida, as placas foram levadas para incubação em estufa bacteriológica a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, em posição invertida, por um período de 18-24 horas. As culturas foram mantidas sob refrigeração (2 a 8°C) e mensalmente foram renovadas por repique em Ágar Caseína Soja até a quinta geração.

Culturas de referência certificadas foram reconstituídas conforme as instruções do fabricante (Lab-Elite™) e identificadas por MALDI-TOF MS

conforme método descrito anteriormente, em duplicata. Destas, foram preparadas e mantidas culturas estoque nas mesmas condições descritas acima.

Os resultados obtidos da identificação prévia das culturas estoque por MALDI-TOF MS foram considerados referência para a interpretação dos dados coletados durante o teste de verificação do método microbiológico alternativo indicado pela USP 39. Para o referido teste, foram feitos repiques para uso imediato a partir das culturas estoque preparadas para o estudo, em Ágar Caseína Soja, adquirido comercialmente estéril e em placas, e incubação em estufa bacteriológica a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, em posição invertida, por um período de 18-24 horas.

4.2.3.2 Identificação bioquímica pelo Sistema BBL Crystal®

Primeiramente, todas as espécies bacterianas selecionadas para o estudo foram submetidas a coloração de Gram, uma vez que o Sistema BBL Crystal® possui kits específicos destinados a identificação de bactérias aeróbias Gram positivas isoladas frequentemente (*BD BBL™ Crystal™ Identification System Gram-Positive ID Kit*) e bactérias aeróbias Gram negativas pertencentes a família *Enterobacteriaceae* assim como alguns bacilos gram-negativos fermentadores e não fermentadores da glicose, isolados com maior frequência (*BD BBL™ Crystal™ Identification System Enteric/Nonfermenter ID Kit*).

O Sistema de identificação BBL Crystal® para bactérias entéricas/não fermentadoras necessita dos resultados dos testes de oxidase e indol. Portanto, as bactérias Gram negativas foram submetidas aos testes da oxidase e indol, respectivamente, com Tiras de Oxidase (Laborclin®) e Reagente de Kovacs (Merck Millipore®). Ambos os testes foram realizados conforme as instruções do folheto informativo dos reagentes e com repiques recentes.

No teste da oxidase, trabalhando próximo a chama, uma tira a temperatura ambiente foi retirada do frasco com o auxílio de uma pinça em aço inoxidável e colocada sobre uma lâmina de microscópio limpa e seca. Usando uma alça estéril de 10 µL, uma colônia da bactéria em análise foi transferida assepticamente e emulsionada sobre a superfície da tira. Em até 2 minutos, foi

observado se houve ou não o desenvolvimento de coloração violeta característica de prova positiva da oxidase.

No teste do indol, trabalhando próximo a chama e com o auxílio de uma alça estéril, cada uma das espécies bacterianas Gram negativas foi inoculada em Água Peptonada 0,1%. Após incubação a 37°C, por 48 horas, foi adicionado 0,5 mL do Reagente de Kovacs a cada meio de cultura, que em seguida foi agitado suavemente. O desenvolvimento de cor vermelha ou violeta indicou um resultado positivo, ou seja, a presença de indol; a falta de cor indicou um resultado negativo, isto é, a ausência de indol.

4.2.3.3 Identificação bacteriana por MALDI-TOF MS

A identificação das espécies bacterianas selecionadas para o estudo por meio do método alternativo MALDI-TOF MS foi realizada conforme descrito no item 4.2.2.

5. RESULTADOS

5.1 Amostragem e quantificação das partículas viáveis

O total de amostragens realizadas por grau de classificação nas áreas limpas estudadas em cada campanha, tendo como base a frequência de monitoramento das partículas viáveis descrita no Quadro 5 (item 4.2.1 do Método), consta no Gráfico 1. No entanto, quando foram obtidos resultados no limite de ação ou acima do limite de especificação, a sala limpa foi monitorada em três dias consecutivos, para avaliação da eficácia da ação. No total, foram amostrados 106 pontos de monitoramento em cada campanha.

Gráfico 1. Frequência de amostragem das partículas viáveis no período considerado.

Fonte: Próprio autor.

As contagens das partículas viáveis foram analisadas conforme os limites estabelecidos para as áreas graus A, B, C e D (Quadro 5, item 4.2.1). As frequências com que foram encontradas contagens dentro desses limites ou acima da especificação constam nos Gráficos 2 e 3, referentes as Campanhas 1 e 2 respectivamente.

Gráfico 2. Frequência de resultados do monitoramento ambiental nos limites estabelecidos e acima da especificação durante a Campanha 1.

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 3. Frequência de resultados do monitoramento ambiental nos limites estabelecidos e acima da especificação durante a Campanha 2.

Fonte: Próprio autor.

Esses resultados foram encontrados em 7 salas limpas durante a Campanha 1, sendo estas as salas 2, 3, 4, 5, 7, 10 e 11 (Gráfico 4), e em 4 salas limpas durante a Campanha 2, sendo estas as salas 2, 4, 9 e 11 (Gráfico 5).

Gráfico 4. Distribuição das contagens nos limites estabelecidos e acima da especificação conforme as salas limpas em que foram observadas durante a Campanha 1.

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 5. Distribuição das contagens nos limites estabelecidos e acima da especificação conforme as salas limpas em que foram observadas durante a Campanha 2.

Fonte: Próprio autor.

No Quadro 8 constam as atividades realizadas em cada uma dessas salas. Observa-se que tanto as salas onde são realizadas atividades auxiliares quanto as que dão lugar ao fluxo de produção propriamente dito apresentaram pontos com contagens dentro dos limites de alerta, ação ou acima do limite de especificação.

Quadro 8. Atividades realizadas nas salas limpas com contagens nos limites estabelecidos e acima da especificação.

Salas	Atividades realizadas	Aplicação
2	Coleta de líquido alantóico	Fluxo de produção
3	Almoxarifado de material estéril, preparo de material, descontaminação e box de lavagem	Função auxiliar
4	Box de lavagem e descarte	Função auxiliar
5	Preparo de inóculo	Função auxiliar
7	Purificação	Fluxo de produção
9	Preparo de soluções	Função auxiliar
10	Preparo de material estéril e lavagem	Função auxiliar
11	Purificação	Fluxo de produção

Fonte: Próprio autor.

As contagens de partículas viáveis dentro dos limites estabelecidos ou acima da especificação foram obtidas por meio de todos os métodos de amostragem utilizados no Programa de Monitoramento Ambiental em estudo. As frequências com que tais métodos evidenciaram resultados superiores ao esperado, nas duas campanhas, são mostradas nos Gráficos 6, 7 e 8.

Gráfico 6. Frequência com que contagens nos limites estabelecidos ou acima da especificação foram recuperados pelo método de amostragem ativa, conforme os graus de classificação dos pontos de amostragem, nas duas campanhas.

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 7. Frequência com que contagens nos limites estabelecidos ou acima da especificação foram recuperados pelo método de amostragem passiva, conforme os graus de classificação dos pontos de amostragem, nas duas campanhas.

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 8. Frequência com que contagens nos limites estabelecidos ou acima da especificação foram recuperados pelos métodos de amostragem de superfície, conforme os graus de classificação dos pontos de amostragem, nas duas campanhas.

Fonte: Próprio autor.

Os operadores das áreas limpas graus A e B foram monitorados conforme a frequência estabelecida pelo Quadro 6 (item 4.2.1). O Gráfico 9 apresenta as amostragens realizadas nas luvas e nos uniformes dos operadores nas duas campanhas estudadas.

Gráfico 9. Frequência de monitoramento de partículas viáveis nos operadores durante as duas campanhas estudadas.

Fonte: Próprio autor.

Notas:

* Uniforme parcial: peito, braços direito e esquerdo, testa.

** Uniforme completo: peito, braços direito e esquerdo, testa, nuca, coxas direita e esquerda, pernas direita e esquerda (atrás).

As frequências com que foram encontradas contagens dentro dos limites de alerta, ação ou acima da especificação nos operadores constam nos Gráficos 10 e 11, referentes as Campanhas 1 e 2 respectivamente.

Gráfico 10. Frequência de resultados do monitoramento dos operadores nos limites estabelecidos e acima da especificação durante a Campanha 1.

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 11. Frequência de resultados do monitoramento dos operadores nos limites estabelecidos e acima da especificação durante a Campanha 2.

Fonte: Próprio autor.

5.2 Identificação dos isolados ambientais

Os isolados ambientais detectados nas salas limpas durante a Campanha 1 evidenciaram a presença de 39 gêneros bacterianos. A população microbiana característica das áreas limpas nesse período foi composta, principalmente, por bactérias dos gêneros *Micrococcus* sp, *Chryseobacterium* sp, *Staphylococcus* sp, *Bacillus* sp e *Rhodococcus* sp. As espécies bacterianas encontradas com maior frequência nas áreas limpas estudadas durante a Campanha 1 constam no Quadro 9, conforme o grau de classificação das mesmas.

Durante a Campanha 2, foram encontrados 27 gêneros bacterianos nas salas limpas estudadas. A população microbiana característica das áreas limpas nesse período foi composta, principalmente, por bactérias dos gêneros *Chryseobacterium* sp, *Stenotrophomonas* sp, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus* sp e *Micrococcus* sp. As espécies bacterianas encontradas com maior frequência nas áreas limpas estudadas durante a Campanha 2 constam no Quadro 10, conforme o grau de classificação das mesmas.

Quadro 9. Espécies bacterianas encontradas com maior frequência nas áreas limpas durante a Campanha 1.

Campanha 1	
Grau A	Grau B
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Bacillus cereus</i> group	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
-	<i>Staphylococcus hominis</i>
-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
-	<i>Staphylococcus capitis</i>
-	<i>Staphylococcus cohnii</i>
-	<i>Staphylococcus equorum</i>
Grau C	Grau D
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Pseudomonas oryzae</i> group	<i>Alcaligenes faecalis</i>
<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>
<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-	<i>Staphylococcus cohnii</i>
-	<i>Delftia acidovorans</i>
-	<i>Escherichia coli</i>

Fonte: Próprio autor.

Quadro 10. Espécies bacterianas encontradas com maior frequência nas áreas limpas durante a Campanha 2.

Campanha 2	
Grau A	Grau B
<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Brachybacterium faecium</i>
<i>Corynebacterium striatum</i>	<i>Leifsonia aquatic</i>
<i>Staphylococcus auricularis</i>	<i>Micrococcus lylae</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
-	<i>Staphylococcus capitis</i>
-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
-	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
-	<i>Staphylococcus warneri</i>
Grau C	Grau D
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Neisseria subflava</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
-	<i>Brevibacillus brevis</i>
-	<i>Acinetobacter baumannii</i>
-	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
-	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
-	<i>Acinetobacter guillouiae</i>
-	<i>Acinetobacter lwoffii</i>

Fonte: Próprio autor.

Os Quadros 11 e 12 apresentam os microrganismos isolados das luvas e roupas dos operadores durante as Campanhas 1 e 2, respectivamente. Os gêneros bacterianos isolados com maior frequência foram *Micrococcus* sp, *Staphylococcus* sp e *Bacillus* sp.

Quadro 11. Espécies bacterianas encontradas em luvas e roupas de operadores das áreas limpas durante a Campanha 1.

Campanha 1		
Luvas		Uniformes
Grau A	Grau B	Grau B
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i> spp urealyticus	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Corynebacterium tuberculostrictum</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>
<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Staphylococcus capitis</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	-	<i>Corynebacterium</i> sp.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	<i>Bacillus pumilus</i>
-	-	<i>Staphylococcus caprae</i>
-	-	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>
-	-	<i>Bacillus</i> sp
-	-	<i>Brachybacterium</i> sp
-	-	<i>Staphylococcus equorum</i>
-	-	<i>Moraxella osloensis</i>
-	-	<i>Pseudomonas stutzeri</i>

Fonte: Próprio autor.

Quadro 12. Espécies bacterianas encontradas em luvas e roupas de operadores das áreas limpas durante a Campanha 2.

Campanha 2		
Luvas		Uniformes
Grau A	Grau B	Grau B
<i>Corynebacterium striatum</i>	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	-	<i>Staphylococcus capitis</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i>	-	-

Fonte: Próprio autor.

5.3 Verificação do método microbiológico alternativo

Os resultados das identificações bacterianas feitas pelos métodos MALDI-TOF MS e BBL Crystal® são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados das identificações das bactérias selecionadas para o estudo pela técnica MALDI-TOF MS e pelo sistema BBL Crystal®.

(continua)

Espécies bacterianas selecionadas para o estudo	Replicata	MALDI-TOF MS		BBL Crystal®	
		Resultado	Score (%)	Resultado	Score (%)
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	88.80	<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp <i>urealyticum</i>	99.99
	2	<i>Staphylococcus cohnii</i>	96.90	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	81.41
	3	<i>Staphylococcus cohnii</i>	96.30	<i>Staphylococcus cohnii</i> ssp <i>urealyticum</i>	35.31
				<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	32.53
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99.90	<i>Staphylococcus simulans</i>	97.61
	2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99.90	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	98.09
	3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	96.60	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	97.88
<i>Micrococcus luteus</i>	1	<i>Micrococcus luteus</i>	99.90	<i>Micrococcus luteus</i>	98.72
	2	<i>Micrococcus luteus</i>	99.90	<i>Micrococcus</i> sp.	99.99
	3	<i>Micrococcus luteus</i>	99.90	<i>Micrococcus</i> sp.	99.99
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97.30	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.99
	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	96.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.99
	3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.99
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	<i>Staphylococcus capitis</i>	99.90	<i>Staphylococcus capitis</i>	97.50
	2	<i>Staphylococcus capitis</i>	99.90	<i>Staphylococcus capitis</i>	99.95
	3	<i>Staphylococcus capitis</i>	99.90	<i>Staphylococcus capitis</i>	99.95
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	<i>Staphylococcus warneri</i>	99.90	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	94.59
	2	<i>Staphylococcus warneri</i>	99.90	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	90.44
	3	<i>Staphylococcus warneri</i>	99.90	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	90.44
<i>Bacillus cereus</i> group	1	<i>Bacillus cereus</i> group	95.00	<i>Bacillus licheniformis</i>	97.62
	2	<i>Bacillus cereus</i> group	99.90	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.97
	3	<i>Bacillus cereus</i> group	95.00	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.99
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	91.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99.99
	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	84.40	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99.99
	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	83.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99.99
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	93.50	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	46.36
	2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	93.50	<i>Shigella</i> sp.	52.64
	3	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	77.00	-	-

Tabela 3. Resultados das identificações das bactérias selecionadas para o estudo pela técnica MALDI-TOF MS e pelo sistema BBL Crystal®.
(conclusão)

Espécies bacterianas selecionadas para o estudo	Replicata	MALDI-TOF MS		BBL Crystal®	
		Resultado	Score (%)	Resultado	Score (%)
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	83.60	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	99.99
	2	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	83.50	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	99.99
	3	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	80.30	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	99.99
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	92.60	<i>Burkholderia cepacia</i>	88.09
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.89
	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97.30	<i>Burkholderia cepacia</i>	88.09
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.89
	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.90	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74.89
				<i>Burkholderia cepacia</i>	24.51
<i>Delftia acidovorans</i>	1	<i>Delftia acidovorans</i>	88.00	-	-
	2	<i>Delftia acidovorans</i>	91.30	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.89
	3	<i>Delftia acidovorans</i>	77.50	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.89
<i>Ralstonia panila</i>	1	Família IV <i>Comamonadaceae</i>	99.90	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	62.24
				<i>Shigella dysenteriae</i>	22.04
	2	Família IV <i>Comamonadaceae</i>	99.90	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	67.11
				<i>Chromobacterium violaceum</i>	26.41
	3	Família IV <i>Comamonadaceae</i>	99.90	<i>Chromobacterium violaceum</i>	76.52
				<i>Pseudomonas oryzae</i>	12.99
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	<i>Staphylococcus aureus</i>	99.90	<i>Staphylococcus aureus</i>	55.24
				<i>Staphylococcus intermedius</i>	44.76
	2	<i>Staphylococcus aureus</i>	99.90	<i>Staphylococcus aureus</i>	75.01
	3	<i>Staphylococcus aureus</i>	99.90	<i>Staphylococcus intermedius</i>	84.49
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	1	<i>Bacillus subtilis</i>	99.90	<i>Bacillus subtilis</i>	98.82
	2	<i>Bacillus subtilis</i>	99.90	<i>Bacillus subtilis</i>	99.99
	3	<i>Bacillus subtilis</i>	99.90	<i>Bacillus subtilis</i>	99.99
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	1	<i>Salmonella enterica</i> ssp <i>enteric</i>	94.60	<i>Salmonella</i> sp.	99.08
	2	<i>Salmonella enterica</i> ssp <i>enteric</i>	86.50	<i>Salmonella</i> sp.	97.23
	3	<i>Salmonella enterica</i> ssp <i>enterica</i>	94.60	<i>Salmonella</i> sp.	99.08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86.00	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.97
	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95.40	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74.89
				<i>Burkholderia cepacia</i>	24.51
	3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.90	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74.89
				<i>Burkholderia cepacia</i>	24.51
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	1	<i>Escherichia coli</i>	93.90	<i>Escherichia coli</i>	99.75
	2	<i>Escherichia coli</i>	99.90	<i>Escherichia coli</i>	99.75
	3	<i>Escherichia coli</i>	99.90	<i>Escherichia coli</i>	99.75

Fonte: Próprio autor.

Nota: * Todas as identificações a nível de género e espécie com score acima de 90% foram consideradas confiáveis para ambos os métodos.

Das 18 espécies bacterianas selecionadas para a avaliação da técnica MALDI-TOF MS, 16 (88,9%) foram corretamente identificadas por esta técnica a nível de gênero e espécie: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus cereus* group, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter johnsonii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Delftia acidovorans*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 8739. Apenas uma espécie (*Ralstonia panila*) não foi corretamente identificada (5,5%) e uma outra (*Chryseobacterium indologenes*) (5,5%) resultou num score abaixo daquele considerado confiável pelo fabricante (90%) (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados das análises feitas pelo método MALDI-TOF MS conforme o nível de identificação obtido nas triplicatas.

(continua)

Espécies bacterianas selecionadas para o estudo	MALDI-TOF MS (nº replicatas)*					
	Gênero correto	Espécie correta	Identificação incorreta	Identificação não uniforme	Não identificado	Identificação não confiável **
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	2	-	-	-	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	3	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	3	3	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	-	-	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	3	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i>	3	3	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> group	3	3	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1	-	-	-	2
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2	2	-	-	-	1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	-	-	-	-	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	3	-	-	-	-
<i>Delftia acidovorans</i>	1	1	-	-	-	2
<i>Ralstonia panila</i>	-	-	3	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	3	3	-	-	-	-
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	3	3	-	-	-	-

Tabela 4. Resultados das análises feitas pelo método MALDI-TOF MS conforme o nível de identificação obtido nas triplicatas.

(conclusão)

Espécies bacterianas selecionadas para o estudo	MALDI-TOF MS (nº replicatas)*					
	Gênero correto	Espécie correta	Identificação incorreta	Identificação não uniforme	Não identificado	Identificação não confiável **
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	2	2	-	-	-	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	2	2	-	-	-	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	3	3	-	-	-	-

Fonte: Próprio autor.

Notas:

* As espécies bacterianas foram testadas em triplicata por ambos os métodos estudados de acordo com as orientações dos fabricantes, totalizando 54 testes.

** Resultados com scores abaixo de 90% foram considerados como identificação não confiável.

As identificações pelo sistema BBL Crystal® renderam 12 (66,6%) acertos a nível de gênero: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus cereus* group, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 8739. Destes, 7 (38,8%) foram a nível de espécie: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus spizizenii*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli*. Duas (11,1%) espécies foram identificadas incorretamente (*Chryseobacterium indologenes* e *Delftia acidovorans*), quatro (22,2%) não obtiveram um valor de score suficiente para serem aceitas (90%) (*Acinetobacter johnsonii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia panila*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e duas (11,1%) resultaram em identificações não uniformes (*Staphylococcus saprophyticus* e *Micrococcus luteus*), onde scores aceitáveis foram obtidos, porém com identificações discrepantes a nível de espécie ou falta de identificação a nível de espécie em alguma das triplicatas (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados das análises feitas pelo sistema BBL Crystal® conforme o nível de identificação obtido nas triplicatas.

(continua)

Espécies bacterianas selecionadas para o estudo	BBL Crystal® (nº replicatas)*					
	Gênero Correto	Espécie Correta	Identificação incorreta	Identificação não uniforme	Não identificado	Identificação não confiável **
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	1	-	-	-	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3	2	-	1	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	3	1	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	3	-	-	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	3	-	-	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i>	3	-	3	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> group	3	-	3	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	3	-	-	-	-
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	-	-	-	-	2	1
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	-	3	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	3
<i>Delftia acidovorans</i>	-	-	2	-	1	-
<i>Ralstonia panila</i>	-	-	-	-	-	3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-	-	-	3
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	3	3	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	3	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1	-	-	-	-	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	3	3	-	-	-	-

Fonte: Próprio autor.

Notas:

* As espécies bacterianas foram testadas em triplicata por ambos os métodos estudados de acordo com as orientações dos fabricantes, totalizando 54 testes.

** Resultados com scores abaixo de 90% foram considerados como identificação não confiável.

O desempenho da técnica MALDI-TOF MS foi melhor do que a do sistema BBL Crystal® em todos os aspectos analisados: identificações corretas a nível de espécie (88,89% e 38,89%, respectivamente), identificações corretas apenas a nível de gênero (0% e 16,67%, respectivamente), identificações não confiáveis (scores abaixo de 90%) (5,55% e 22,22%, respectivamente), identificações não uniformes entre as triplicatas (0% e 11,11%, respectivamente) e identificações incorretas (5,55% e 11,11%, respectivamente) (Tabela 6).

Tabela 6. Concordância entre as identificações pela técnica MALDI-TOF MS e pelo sistema BBL Crystal® para as espécies bacterianas estudadas.

BBL Crystal®	MALDI-TOF MS					Total (%)
	ID espécie (%)	ID gênero (%)	Nenhuma ID (%)	ID não uniforme (%)	ID incorreta (%)	
ID espécie (%)	7 (38,89%)	0	0	0	0	7 (38,89%)
ID gênero (%)	3 (16,67%)	0	0	0	0	3 (16,67%)
Nenhuma ID (%)	3 (16,67%)	0	0	0	1 (5,55%)	4 (22,22%)
ID não uniforme (%)	2 (11,11%)	0	0	0	0	2 (11,11%)
ID incorreta (%)	1 (5,55%)	0	1 (5,55%)	0	0	2 (11,11%)
Total (%)	16 (88,89%)	0	1 (5,55%)	0	1 (5,55%)	18 (100%)

Fonte: Próprio autor.

Nota:

*As espécies bacterianas selecionadas foram testadas em triplicata pela técnica MALDI-TOF MS e pelo sistema BBL Crystal®, de acordo com as instruções dos fabricantes. Para ambos os métodos, o *score* mínimo aceitável foi de 90%, tanto para gênero quanto para espécie. ID espécie = identificação a nível de espécie; ID gênero = identificação correta apenas a nível de gênero; Nenhuma ID = *scores* abaixo de 90%; ID não uniforme = resultados considerados confiáveis (*score* acima de 90%), porém discrepantes na triplicata; ID incorreta = identificação incorreta a nível de gênero.

Os valores de *p* foram calculados por meio da comparação entre os resultados de identificação obtidos por meio do método MALDI-TOF MS e do sistema BBL Crystal® (Teste exato de Fisher) (Tabela 7). Os resultados dos cálculos de exatidão a nível de gênero e espécie são mostrados na Tabela 8.

Tabela 7. Identificações por MALDI-TOF MS e pelo sistema BBL Crystal® comparadas às identificações finais.

Parâmetro de identificação	Identificação por MALDI-TOF MS (nº de isolados [%])	Identificação por BBL Crystal® (nº de isolados [%])	Valor p
Gênero correto	16 (88,89%)	12 (66,67%)	NS
Espécie correta	16 (88,89%)	7 (38,89%)	<0,01
Nenhuma identificação	1 (5,55%)	4 (22,22%)	NS
Identificação não uniforme	0	2 (11,11%)	NS
Identificação incorreta	1 (5,55%)	2 (11,11%)	NS

Fonte: Próprio autor.

Notas:

* As espécies bacterianas selecionadas foram testadas em triplicata por MALDI-TOF MS e pelo sistema BBL Crystal®. As identificações finais foram estabelecidas por análise prévia realizada por MALDI-TOF MS com scores acima de 90%, conforme recomendado do fabricante.

** NS = estatisticamente não significativo.

Tabela 8. Medidas da exatidão a nível de gênero e espécie da técnica MALDI-TOF MS e do sistema BBL Crystal®.

Critério para identificação	MALDI-TOF MS		BBL Crystal	
	Número de resultados corretos	Exatidão	Número de resultados corretos	Exatidão
A nível de espécie	16	88,89%	7	38,89%
A nível de gênero	16	88,89%	12	66,67%

Fonte: Próprio autor.

6. DISCUSSÃO

Os microrganismos são encontrados em praticamente todos os ambientes. Uma vez que as condições ótimas de sobrevivência e crescimento de muitos deles coincidem com as quais vivem as populações humanas, é inevitável a convivência com grande quantidade deles. Estão na superfície do corpo humano, assim como no trato digestivo e em outros orifícios naturais. Essa ubiquidade e o risco que a contaminação microbiana de medicamentos oferece aos usuários evidenciam a importância do controle microbiológico das áreas produtivas (ANVISA, 2013; HALLS, 2004).

Os dados de monitoramento ambiental evidenciados neste trabalho tiveram a função de proporcionar uma visão geral do contexto no qual os métodos rápidos para identificação microbiana estão sendo inseridos. Observa-se a importância da prática do controle microbiológico e a necessidade fundamental de métodos rápidos e confiáveis quando este controle é um dos principais parâmetros que garantirá a liberação segura de um produto estéril (BRASIL, 2010b). O monitoramento ambiental provê a evidência e documentação necessárias para determinar a eficiência de diferentes sistemas empregados na prevenção da contaminação microbiana, assegurando a qualidade microbiológica do produto final (JIMENEZ, 2004).

Em um Programa de Monitoramento Ambiental, a frequência de amostragem depende da criticidade dos locais de monitoramento e do tratamento ao qual o produto é submetido após o processo asséptico. Locais que exigem altíssimo grau de limpeza, como nas proximidades de onde ocorre a exposição do produto e superfícies que entram em contato com o mesmo, são considerados zonas críticas e tratados como campos estéreis, exigindo a amostragem a cada operação realizada. Produtos envasados em ambiente asséptico e submetidos a esterilização terminal demandam mais cuidados na identificação e quantificação dos microrganismos que resistem a esse processo do que uma amostragem de monitoramento ambiental mais frequente (USP, 2015).

No Gráfico 1 consta o total de amostragens realizadas nas áreas limpas estudadas em cada campanha. Embora não seja possível observar números de amostragens crescentes de acordo com graus de limpeza mais rígidos,

devido a diferença na quantidade de áreas classificadas em cada grau, essa informação evidencia a abrangência do Programa de Monitoramento Ambiental e o resultado prático de seguir a orientação dada pela RDC nº 17/2010 quanto a frequência de amostragem. Amostragens amplas, como as observadas, independentemente do grau de sofisticação, não podem fazer do monitoramento de rotina uma ferramenta capaz de identificar e quantificar todos os contaminantes microbianos presentes nos ambientes controlados. Apesar disso, um Programa de Monitoramento Ambiental bem planejado e executado provê informações suficientes para determinar que o ambiente controlado está operando dentro de um estado de controle adequado (ANVISA, 2013).

O limite de alerta estabelecido pelo fabricante consiste em fator determinante, com efeito direto sobre a decisão de identificação microbiana. Uma vez ultrapassado o limite de alerta, os microrganismos devem ser identificados para que ações corretivas possam ser tomadas. No entanto, é a especificação de cada limite que orienta distintos efeitos para estas ações. As ações consequentes a tais ocorrências têm efeito direto sobre as áreas produtivas, devido ao risco potencial a que o produto está exposto (BRASIL, 2010b). Nos Gráficos 2, 3, 4 e 5 é possível observar a frequência com que o monitoramento ambiental estudado demandou ações tomadas com base na identificação microbiana. As vantagens do método rápido nesse contexto recaem precisamente na possibilidade de dar uma resposta rápida e assertiva para retomada do controle microbiológico da sala e garantia da qualidade do produto (SANDLE et al, 2014).

Os equipamentos utilizados nos processos de produção contribuem para a disseminação de partículas viáveis e não viáveis nas áreas limpas (USP, 2015). No Quadro 8 observa-se a presença de salas com fluxo de produção, onde há equipamentos. Apesar de, segundo a USP 38 (2015), estudos indicarem que a proporção de partículas não viáveis liberadas por equipamentos é maior em comparação com as viáveis, deve-se considerar que estas podem ser carregadas por aquelas, e por isso o controle microbiológico não deixa de ser importante, mesmo em sala com fluxo de produção, onde o nível de partículas não viáveis tende a ser maior (BRASIL, 2010b; USP, 2015).

Nos Gráficos 6, 7 e 8 é possível observar a frequência com que, respectivamente, os métodos de amostragem ativo, passivo e de superfície detectaram contagens microbianas nos limites estabelecidos ou acima da especificação. As contagens discrepantes que esses métodos apresentaram, considerando o mesmo grau de classificação das salas e a mesma campanha, se deu pela própria natureza dos métodos. Segundo a Farmacopeia Brasileira 5a ed. (2010), as placas de sedimentação proveem informações qualitativas sobre o ambiente a que estão expostas, não sendo apropriadas para avaliação quantitativa. Já os amostradores de ar têm a função de fornecer dados quantitativos, porém o tamanho da amostra de ar interfere diretamente na obtenção de um resultado preciso e exato, assim como o tempo de amostragem (BRASIL, 2010b). Consideração adicional consiste na melhor simulação do método passivo em relação ao que ocorre na situação de se ter um produto exposto ao ambiente. Em suma, cada método fornece informações distintas (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

O Gráfico 9 evidencia a grande quantidade de amostragens realizadas nos operadores das áreas limpas graus A e B. Os seres humanos são tidos como a principal fonte de contaminação em áreas classificadas. Isso porque há uma liberação constante de microrganismos que estão na superfície do corpo humano, assim como no trato digestivo e em outros orifícios naturais. Portanto, quanto maior o potencial de contato pessoal com o produto, maior a importância do monitoramento ambiental, principalmente para produtos não submetidos à esterilização terminal (ANVISA, 2013; BRASIL, 2010b; JIMENEZ, 2004; USP, 2015). Os resultados que constam nos Gráficos 10 e 11 comprovam o quanto os operadores oferecem risco microbiológico para as áreas limpas.

Nos Quadros 9 e 10 constam as espécies bacterianas encontradas com maior frequência nas áreas limpas durante as Campanhas 1 e 2, respectivamente. A presença de determinadas espécies microbianas nas áreas limpas pode ser relacionada a fatores de risco. Vale lembrar que, em produtos injetáveis a criticidade independe da natureza do microrganismo. Ainda assim, deve-se considerar que os Gram negativos, além de oferecerem risco microbiológico, podem induzir reações pirogênicas no paciente. Por sua vez,

aqueles que se caracterizam por patogenicidade elevada poderão ser produtoras de distintas toxinas (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Observa-se que grande parte das bactérias isoladas em luvas e roupas de operadores são pertencentes ao grupo dos cocos, muito comuns na pele e mucosa humanas (Quadros 11 e 12) (USP, 2015). Assim, os resultados mostram a possibilidade de que estes microrganismos, provavelmente oriundos da microbiota normal dos operadores, tenham sido carreados por estes para as salas limpas. Tais dados levam a reiterar a necessidade de treinamento dos funcionários que trabalham em áreas limpas. É necessário não apenas instruí-los sobre o comportamento mais adequado dentro de uma sala limpa, mas também conscientizá-los de que eles são a principal fonte de contaminação neste ambiente e por isso, a sua colaboração é de extrema importância para a obtenção de um produto seguro (BRASIL, 2010b; HALLS, 2004).

A escolha dos microrganismos para o presente estudo foi baseada na alta frequência de isolamento dessas espécies nas salas limpas estudadas e nos poucos dados encontrados na literatura sobre diversidade microbiana em salas limpas farmacêuticas, que serão citados a seguir. Utescher e colaboradores (2007), em sua avaliação de um programa de monitoramento ambiental para salas limpas farmacêuticas em uma produção de medicamentos biológicos brasileira, evidenciaram que a população microbiana típica encontrada foi composta por bactérias dos gêneros *Staphylococcus sp*, *Micrococcus sp* e *Bacillus sp*, com predominância de *Staphylococcus sp* em todas as áreas. Esses três gêneros bacterianos têm uma distribuição ubíqua. Eles foram isolados do meio ambiente ou em seres humanos e membranas mucosas. Por isso a importância da presença de espécies desses gêneros em estudos sobre adequabilidade de métodos de identificação microbiana para serem empregados no contexto da produção farmacêutica.

Sandle (2011), em sua revisão sobre a microflora típica das salas limpas farmacêuticas, examinou diversas áreas limpas localizadas em vários estabelecimentos da Inglaterra e do País de Gales utilizados para a fabricação de produtos derivados de sangue, no período de 2001 a 2009. Os microrganismos recuperados foram representados por seis gêneros principais, entre eles *Staphylococcus sp*, *Micrococcus sp*, *Bacillus sp* and *Pseudomonas sp*. Das dez espécies mais ocorrentes nesses ambientes estavam *Micrococcus*

luteus, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus capitis*. Abreu, Pinto e Oliveira (2003) também encontraram alta frequência dos gêneros *Bacillus sp* e *Staphylococcus aureus* em seu estudo sobre monitoramento ambiental de áreas limpas.

Os fungos e leveduras não foram abordados neste trabalho, pois, conforme descrito na literatura, a análise desses microrganismos por MALDI-TOF MS ainda é frágil devido à baixa reprodutibilidade. Além disso, os efeitos de seus diferentes estados fisiológicos na confiabilidade dos métodos de identificação são ainda controversos (USBECK et al., 2013). A identificação de fungos por MALDI-TOF-MS requer também um pré-tratamento da amostra antes da aquisição dos espectros, envolvendo uma extração completa do material fúngico (CASSAGNE et al., 2013). Este processo precisa ser estudado mais profundamente para a identificação de fungos isolados do ambiente de salas limpas farmacêuticas.

A técnica empregada no método rápido alternativo estudado, a MALDI-TOF MS, tem seu uso disseminado nos laboratórios microbiológicos, principalmente naqueles da área clínica (BUCHAN; LEDEBOER, 2014; VAN BELKUM, 2007; WIESER et al., 2012).. Entretanto, quando se trata de laboratórios de controle microbiológico de qualidade de produtos farmacêuticos, os estudos são limitados, dificultando a comparação de resultados obtidos a partir desta técnica com aqueles obtidos no mesmo contexto de isolados ambientais.

As bibliotecas de espectros que compõem as bases de dados dos espectrômetros de massas disponíveis para identificação microbiana têm seu foco na microbiologia clínica, o que dificulta a aplicação da técnica no âmbito das salas limpas, uma vez que não é possível saber previamente as características dos microrganismos que serão isolados. Esta dificuldade demanda, por parte dos fabricantes do equipamento, o aprimoramento das bibliotecas e das técnicas de preparo de amostra, visto que a variabilidade composicional dos microrganismos passíveis de serem encontrados no ambiente é muito grande e interfere na exatidão da técnica (CHAO et al., 2014; CHARNOT-KATSIKAS et al., 2014; JAMAL et al., 2014).

No entanto, os resultados deste estudo revelaram um excelente desempenho da MALDI-TOF MS em comparação com a técnica de

identificação convencional (identificação bioquímica) para a identificação correta das espécies (88,89% e 38,89%, respectivamente) (Tabela 8). Outros autores também encontraram a mesma evidência, embora não tenham sido isolados microrganismos do monitoramento ambiental de salas limpas farmacêuticas. Van Veen, Claas e Kuijper (2010) realizaram um estudo com 1307 isolados clínicos de bactérias e leveduras de vários gêneros, como *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. O desempenho geral do MALDI-TOF MS foi significativamente melhor do que os sistemas bioquímicos convencionais (Vitek®2, API® e testes bioquímicos) para a identificação correta das espécies (92,2% e 83,1%, respectivamente).

Guo e colaboradores (2014) em seu estudo comparativo de MALDI-TOF MS e Vitek®2 na identificação de bactérias encontraram uma precisão de 96,5% e uma menor taxa de erro de identificação no desempenho de MALDI-TOF MS, tornando-se melhor em identificar bactérias do que Vitek®2. As bactérias foram rotineiramente isoladas de pacientes clínicos de um Hospital Geral em Pequim. Seng e colaboradores (2009) também concluíram que MALDI-TOF MS pode substituir sistemas convencionais para identificação de bactérias em um laboratório clínico convencional. Dos 1660 isolados bacterianos analisados, 95,4% foram identificados corretamente pelo MALDI-TOF MS; 84,1% foram identificados no nível da espécie e 11,3% foram identificados no nível do gênero.

A maioria dos estudos usa o sistema Vitek®2 como método bioquímico para comparação com a técnica MALDI-TOF. Não foram encontrados estudos utilizando o sistema BBL Crystal como um método convencional para a comparação dos resultados.

O método microbiológico de identificação bioquímica, BBL Crystal® foi escolhido para a comparação com a técnica MALDI-TOF MS apesar de também ser considerado um método rápido. Isso ocorreu devido ao fato de que esse sistema miniaturizado foi elaborado conforme o princípio dos métodos microbiológicos compendiais para identificação microbiana, ou seja, o cultivo em meios de cultura apropriados para demonstrar as características fisiológicas de cada microrganismo capazes de diferenciá-los dos demais. Dessa forma, algumas limitações desses métodos ainda podem ser encontradas no BBL

Crystal®, como a variabilidade dos microrganismos em sua resposta aos meios de cultura, ocasionando subjetividade na leitura dos resultados, o que, por sua vez, pode levar a identificações equivocadas (BD, 2017).

A maior importância do presente estudo é a implementação da técnica MALDI-TOF MS na rotina de um ambiente de salas limpas farmacêuticas e a comparação do mesmo com um sistema de identificação convencional em isolados ambientais. Uma limitação do estudo é a falta de uso do sequenciamento do rRNA 16S para análise de discrepâncias, uma vez que a identificação tradicional de bactérias com base em características fenotípicas geralmente não é tão precisa como a identificação com base em métodos genotípicos (CLARRIDGE, 2004). No entanto, bons resultados obtidos com a tecnologia MALDI-TOF e descritos na literatura ao longo dos anos podem minimizar essa limitação (SAKHNO; GUNAR, 2016).

Além de ser uma técnica muito menos trabalhosa e capaz de prover resultados acurados e confiáveis em poucos minutos a partir de uma única colônia isolada, MALDI-TOF MS também pode gerar uma redução de custos significativa para os laboratórios. Tran e colaboradores (2015) reconhecendo as vantagens da técnica MALDI-TOF MS em comparação com métodos convencionais realizaram um estudo comparativo para determinar a quantia que pode ser economizada pelos laboratórios ao substituir os métodos de identificação bioquímica pela técnica MALDI-TOF MS. Foi feita uma análise de custo total, incluindo custos de reagentes, tempo do tecnólogo, além de despesas com serviços de manutenção. O uso da técnica MALDI-TOF MS resultou numa economia anual de 51,7% e o custo inicial de aquisição do equipamento, apesar de alto, pode ser recuperado em aproximadamente 3 anos.

Por fim, MALDI-TOF MS é uma técnica simples, rápida e barata para a identificação de bactérias, incluindo bactérias isoladas do monitoramento ambiental de salas limpas farmacêuticas, e pode ser implementada em um ambiente convencional de laboratório de controle de qualidade farmacêutica. Embora a técnica tenha uma alta precisão para a identificação bacteriana, o desempenho pode ser melhorado com o aprimoramento dos bancos de dados.

7. CONCLUSÕES

A avaliação comparativa dos métodos que empregam as técnicas de MALDI-TOF MS e de identificação bioquímica mostrou que ambos podem ser utilizados para a identificação dos microrganismos selecionados para o estudo, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros de identificação avaliados. No entanto, no estudo de verificação dos métodos, aquele baseado na técnica MALDI-TOF MS apresentou resultados de exatidão superiores e, portanto, melhor desempenho no contexto de identificação de isolados ambientais.

O mapeamento geral dos microrganismos presentes nas áreas limpas estudadas mostrou que a população microbiana característica desses ambientes é composta em grande parte por bactérias pertencentes ao grupo dos cocos, muito comuns na pele e mucosa humanas.

Por fim, a técnica MALDI-TOF MS se mostrou adequada para a identificação de rotina dos microrganismos presentes nas áreas limpas estudadas, tanto aqueles isolados do ar e superfícies quanto das luvas e roupas dos operadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABNT. Associação Brasileira De Normas Técnicas. Salas limpas e ambientes controlados associados – Parte 1: Classificação da limpeza do ar. In: **ABNT NBR ISO 14644-1**. 2005. p. 27.

ABREU, C. S. **Áreas limpas: estudo de correlação entre partículas viáveis e não viáveis**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 1999.

ABREU, C. S.; PINTO, T. J. A.; OLIVEIRA, D.C. Áreas limpas: estudo de correlação entre partículas viáveis e não viáveis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 2, p. 177-184, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v39n2/08.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2017.

ALPHA CONTROLS & INSTRUMENTATION INC. **Air Trace® Environmental Slit-to-Agar Sampler**. 2017. Disponível em: <http://www.alphacontrols.com/Particle_Measuring_Systems/pharmaceutical_environmental_monitoring/microbial_air_sampling/air_trace_environmental_slit-to-agar_sampler>. Acesso em: 28 mai. 2017.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Guia da Qualidade para Sistemas de Tratamento de Ar e Monitoramento Ambiental na Indústria Farmacêutica**. 1a ed. Brasília; 2013. 56 p.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 45, de 02 de julho de 2014. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 julho 2014. Seção 1, pág. 122.

ANDON, B. M. Active Air vs. Passive Air (Settle Plate) Monitoring in Routine Environmental Monitoring Programs. **PDA J Pharm Sci and Tech**, v. 60, n. 6, p. 350-355, 2006.

ASCOM. **Métodos alternativos para Farmacopeia entrarão em consulta pública**. Assessoria de Imprensa da Anvisa. 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=metodos-alternativos-para-farmacopeia-entrarao-em-consulta-publica&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=229500&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content>. Acesso em: 04 jul. 2017.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BD. Becton, Dickinson And Company. **Sistemas de Identificação BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID Kit**. 2004. Disponível em: <<http://www.interlabdist.com.br/dados/produtos/bula/doc/884748d3a46abdee9.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2017.

_____. **BD BBL Crystal**. 2017. Disponível em: <http://www.bdj.co.jp/micro/products/bd-bblcrystal.html#block_top1>. Acesso em: 02 jun. 2017.

BIOLOG. **Microbial identification state-of-the-science performance with unmatched power & versatility**. 2011 Disponível em: <<http://www.biolog.com/pdf/milit/00A%20024%20rB%20MicroSystemsBrochure.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2017.

BIOMANGUINHOS. **Quem somos**. 2015. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/home/quem-somos>>. Acesso em: 20 out. 2015.

BIOMERIEUX. **VITEK® 2 Compact**. 2016. Disponível em: <http://www.biomerieux.ca/servlet/srt/bio/canada/dynPage?open=CAN_IND_FDA_PRD&doc=CAN_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_30&pubparams.sform=4&lang=ca_en>. Acesso em: 17 jun. 2017.

_____. **VITEK® BCL test kit (20cards)**. 2017a. Disponível em: <<http://biomerieuxdirect.com/industry/Bacteriology/ID-AST-Auto/Automated-%3A-VITEK-system/Vitek2-ID-Cards/VITEK-2-ID-test-64-Wells-Colo/VITEK%26reg%3B-BCL-TEST-KIT-%2820CARDS%29/p/21345>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

_____. **VIDAS®: automated food pathogen detection system**. 2017b. Disponível em: <<http://www.biomerieux-industry.com/food/vidas-systems>>. Acesso em 18 jun. 2017.

_____. **VITEK® MS: Sistema de identificação microbiana de espectrometria de massa**. 2017c. Disponível em: <<http://www.biomerieux.com.br/produto/vitek-ms>>. Acesso em 18 jun. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre boas práticas de fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 abr. 2010a. Seção 1, p. 94. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/2409300/pg-94-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-19-04-2010>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

_____. **Farmacopeia brasileira**, volume 1. 5a ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária .Brasília: Atheneu; 2010b. 546 p.

BUCHAN, B. W.; LEDEBOER, N. A. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 27, n. 4, p. 783–822, 2014. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/27/4/783.long>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

CARDOSO, R. C. **O estado de Goiás e a agricultura biotecnológica**. Goiânia: Pontifícia Universidade Católica De Goiás, 2015. Disponível em: <<http://tede2.pucgoias.edu.br:8080/bitstream/tede/2714/1/RENATA%20CARVALHO%20CARDOSO.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

CASSAGNE, C.; CELLA, A. L.; SUCHON, P.; NORMAND, A. C.; RANQUE, S.; PIARROUX, R. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. **Med Mycol.**, v. 51, n. 4, p. 371–377, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/13693786.2012.720720>>. Acesso em 16 jun. 2016.

CHAO, Q-T.; LEE, T-F.; TENG, S-H.; PENG, L-Y.; CHEN, P-H.; TENG, L-J.; et al. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. **PLoS One**, v.9, n. 10, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4199611&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 out.2016.

CHARNOT-KATSIKAS, A.; TESIC, V.; BOONLAYANGOOR, S.; BETHEL, C.; FRANK, K. M. Prospective evaluation of the VITEK MS for the routine identification of bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory: assessment of accuracy of identification and turnaround time. **J Med Microbiol.** V. 63, p. 235–41, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227878>>. Acesso em 15 out.2016.

CLARK, A. E. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 547–603, Jul. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719498/>>. Acesso em 02 jul. 2017.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 4, p. 840–862, 2004. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/17/4/840.full>>. Acesso em 26 jul. 2016

CMLAB. **Sistema de identificacion bacteriana API bioMerieux**. 2016. Disponível em: <<http://www.cmlab.com.co/producto/sistema-de-identificacion-bacteriana-api-biomerieux/>>. Acesso em: 30 mai. 2017.

CONCERN-ENERGOMASH. **VITEK® 2 compact: product safety**. 2014. Disponível em: <<http://c-e.am/en/products/vitekindustri-1362>>. Acesso em: 14 jun. 2017.

CUNDELL, A. M. Microbial identification strategies in the pharmaceutical industry. **PDA J Pharm Sci and Tech**, v. 60, n. 2, p. 111-123, 2006.

DARE, D. Microbial identification using MALDI-TOF MS. In: MILLER, M (Ed.). **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Volume 3. Maryland: DHI Publishing; 2005. p. 195–215.

DINIZ, M.O.; FERREIRA, L.C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos avançados**, v. 24, n.70, p. 19-30, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ea/v24n70/en_a03v2470.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2017.

DIRECT INDUSTRY. **Microbiological monitoring air sampler**. 2017. Disponível em: <<http://www.directindustry.com/prod/merck-millipore/product-31514-456535.html>>. Acesso em: 28 mai. 2017.

DOMINGUES, C. M. A. S.; TEIXEIRA, A. M. D. S. Coberturas vacinais e doenças imunopreveníveis no Brasil no período 1982-2012: avanços e desafios do Programa Nacional de Imunizações. **Epidemiol e Serviços Saúde**, v. 22, n. 1, p. 9–27, 2013. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742013000100002&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 28 fev. 2017.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA CONVENTION. **European Pharmacopoeia**. 6a ed. European Union: Council; 2007.

FARRUKH, N. **Api 20e**. 2015. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/nomanfarrukh3/api-20-e/31?smtNoRedir=1>>. Acesso em: 02 jun. 2017.

FDA. United States Food and Drug Administration. **What is a biological product?** 2016. Disponível em: <<https://www.fda.gov/aboutfda/transparency/basics/ucm194516.htm>>. Acesso em: 27 abr. 2017.

FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M. Análise de perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo. **EMBRAPA**, 2010. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_163.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2017.

FERNANDES, M. F.; SAXENA, J.; DICK, R. P. Comparison of Whole-Cell Fatty Acid (MIDI) or Phospholipid Fatty Acid (PLFA) Extractants as Biomarkers to Profile Soil Microbial Communities. **Microbial Ecology**, v. 66, n. 1, p 145–157, 2013. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00248-013-0195-2>>. Acesso em: 04 mai. 2017.

FIOCRUZ. **Vacinas ainda são uma das armas mais eficazes para prevenir doenças**. 2014. Disponível em: <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/dia-nacional-da-vacinacao-brasil-oferece-42-tipos-de-imunobiologicos-para-prevencao-e>>. Acesso em 17 nov. 2015.

FUNG, D. Y.C. Rapid methods and automation in microbiology. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 1, 2002.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology: a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 471 – 499, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975005000340#tbl1>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

GUO, L.; YE, L.; ZHAO, Q.; MA, Y.; YANG, J.; LUO, Y. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. **Journal of Thoracic Disease**, v. 6, n. 5, p. 534-538. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4015025/>>. Acesso em: 14 ago. 2016.

HALLS, N. Microbiological environmental monitoring. In: HALLS, N. **Microbiological contamination control in pharmaceutical clean rooms**. Florida: CRC Press LLC, 2004. Capítulo 2. ISBN 0-8493-2300-2.

HOMMA, A.; MOREIRA, M. Novos desafios para capacitação tecnológica nacional de vacinas: inovação tecnológica autóctone e transferência de tecnologia. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 238, 2008.

INSTITUTO BUTANTAN. **Vacinas**. 2014. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br/?page_id=680>. Acesso em: 20 out. 2015.

INTERFARMA. **Entendendo os Medicamentos Biológicos**. p. 1–28. 2012. Disponível em: <<https://www.interfarma.org.br/public/files/biblioteca/34-biologicos-site.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

JAMAL, W. Y.; AHMAD, S.; KHAN, Z. U.; ROTIMI, V. O. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. **Int J Infect Dis**, International Society for Infectious Diseases, v. 26, p. 3–6, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25080355>>. Acesso em: 15 out. 2016.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. **Food Microbiology**, v. 27, p. 710-730, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002010000821>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

JIMENEZ, L. Environmental monitoring. In: JIMENEZ, L. **Microbial contamination control in the pharmaceutical industry**. New York: CRC Press, 2004. Capítulo 5. ISBN 978-0-8247-5753-3.

KAUR, K.; SULLIVAN, M.; WILSON, P. C. Targeting B cell responses in universal influenza vaccine design. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 11, 2011. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490611001487?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

KICMAN, A.T.; PARKIN, M. C.; ILES, R. K. An introduction to mass spectrometry based proteomics - detection and characterization of gonadotropins and related molecules. **Molecular and Cellular Endocrinology** 260–262, p. 212–227, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720706004898?via%3Dihub>>. Acesso em 02 jul. 2017.

LOPES, D. S. A.; PESSOA, M. H. N.; SANTOS, R. S.; BARBOSA, M. S. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de *diabetes mellitus*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 1, p. 234-245, 2012. Disponível em: <<http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/248/pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

MARTINY, D.; BUSSON, L.; WYBO, I.; AIT EL HAJ, R.; DEDISTE, A.; VANDENBERG, O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol.**, v. 50, n. 4, p.1313–25, 2012.

MERCK MILLIPORE CORPORATION. **Amostrador de ar microbiológico RCS High Flow Touch**. 2017. Disponível em: <https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/RCS-High-Flow-Touch-Microbial-Air-Sampler,MDA_CHEM-144194>. Acesso em: 30 mai 2017.

MIDI INC. **Sherlock™ microbial id system: bacteria and yeast id by fatty acid analysis**. 2017. Disponível em: < http://www.midi-inc.com/pages/microbial_id.html>. Acesso em: 04 jul. 2017.

MILLER, M. J. Microbiology Series. Article 6: The implementation of rapid microbiological methods. **European Pharmaceutical Review**, v. 15, n. 6, p. 27-31, 2010. Disponível em: < http://www.lumibyte.eu/wp-content/uploads/2013/08/Miller_Microbiology6_2010.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2017.

MOXON, E. R.; DAS, P.; GREENWOOD, B.; HEYMAN, D. L.; HORTON, R.; LEVINE, O. S.; PLOTKIN, S.; NOSSAL, G. A call to action for the new decade of vaccines. **The Lancet**, v. 378, p. 298-302, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673611607666?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. 948 p.

PALOMARES, O.; CRAMERI, R.; RHYNER, C. The contribution of biotechnology toward progress in diagnosis, management, and treatment of allergic diseases. **Allergy**, v. 69, p. 1588–1601, 2014. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12533/full>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

PDA. PARENTERAL DRUG ASSOCIATION. **Technical Report nº 33**. Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods. Parenteral Drug Association, Inc., 2013.

PIKE TECHNOLOGIES. **FT-IR Spectroscopy for Classification of Bacteria, Yeast and Fungi at the Genus Level**. 2014. Disponível em: <<http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=10494>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

PINCUS, D. H. Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. In: MILLER, M (Ed.). **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Volume 3. Maryland: DHI Publishing; 2005. p. 01–32.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4a ed. São Paulo: Atheneu; 2015. 416 p. ISBN 978-85-204-3776-6.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: the Fourth Century. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 12, p. 1709–1719, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786381/pdf/0290-09.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

PRECIOSO, A. R.; PALACIOS, R.; THOMÉ, B.; MONDINI, G.; BRAGA, P.; KALIL, J. Clinical evaluation strategies for a live attenuated tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, v. 33, p. 7121–7125, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X1501395X>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

REIS, C.; CAPANEMA, L. X. L.; FILHO PALMEIRA, P. L.; PIERONI, J. P.; BARROS, J. O.; DA SILVA, L. G. Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. **BNDES Setorial**, n. 29, p. 359–92, 2009. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/Set2910.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2017.

RIEDEL, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. **BUMC Proc**, v. 18, p. 21–5, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1200696/pdf/bumc0018-0021.pdf>>. Acesso em 28 fev. 2017.

ROSSI, G. M. **Biotecnologia no Brasil: uma análise empírica a partir dos dados da PINTEC**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/13567/1/BiotecnologiaBrasilAnalise.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

SAKHNO, N. G.; GUNAR, O. V. Microbial identification methods in pharmaceutical analysis: comparison and evaluation. **Mathews Journal of**

Pharmaceutical Science, v. 1, n. 1, p. 001, 2016. Disponível em: <http://mathewsopenaccess.com/PDF/pharmaceutical-science/M_J_Pharm_1_1_001.pdf>. Acesso em: 24 out. 2016.

SANDLE, T. A review of cleanroom microflora: types, trends, and patterns. **PDA J Pharm Sci and Tech.**, v. 65, n. 4, 2011. Disponível em: <<http://journal.pda.org/content/65/4/392.long>>. Acesso em: 03 mar. 2017.

_____. Approaching the Selection of Rapid Microbiological Methods. **Journal of Validation Technology**, v. 20, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://www.ivtnetwork.com/article/approaching-selection-rapid-microbiological-methods>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

SANDLE, T.; LEAVY, C.; JINDAL, H.; RHODES, R. Application of rapid microbiological methods for the risk assessment of controlled biopharmaceutical environments. **J Appl Microbiol.**, v. 116, n. 6, p.1495-505, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24575809>>. Acesso em: 03 mar. 2017.

SANDLE, T.; SKINNER, K.; SANDLE, J.; GEBALA, B.; KOTHANDARAMAN, P. Evaluation of the GEN III OmniLog® ID System microbial identification system for the profiling of cleanroom bacteria. **European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 1-6, 2013. Disponível em: <http://www.lumibyte.eu/wp-content/uploads/2013/08/Miller_Microbiology6_2010.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2017.

SANTOS, C. M. A.; MARIA, A. Epidemiologia das doenças imunopreveníveis e coberturas vacinais no Brasil. Como estamos? **Rev Imunizações**, v. 7, p.16–21, 2014. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/revista-imunizacoes-sbim-v7-n3-2014-141208-bx.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2015.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. **Gram-negative bacterial cell wall, illustration.** 2017a. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/843332/view>>. Acesso em: 04 jun. 2017.

_____. **Gram-negative bacterial cell wall, illustration.** 2017b. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/843334/view>>. Acesso em: 04 jun. 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2016. **Informe epidemiológico**, 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/05/Informe-Epidemiologico-Influenza-2016-SE-52.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; SCOLA, B. L.; FOURNIER, P. E.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-

flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 543–51. Disponível em: <<https://doi.org/10.1086/600885>>. Acesso em 20 jan. 2016.

SILVA JUNIOR, J.B. 40 anos do Programa Nacional de Imunizações: uma conquista da Saúde Pública brasileira. **Epidemiol e Serviços Saúde**, v. 22, n.1, p. 7–8, 2013. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742013000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 10 out. 2016.

SMITH, J.; LIPSITCH, M.; ALMOND, J. R. W. Vaccine production, distribution, access, and uptake. **The Lancet**, v. 378, p. 428–38, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673611604789?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

TAGUE, T. Microbial identification using FT-IR. **Spectroscopy**, 2008. Disponível em: <<http://www.spectroscopyonline.com/microbial-identification-using-ft-ir>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

THAM, K. W.; ZURAIMI, M. S. Size relationship between airborne viable bacteria and particles in a controlled indoor environment study. **Indoor Air**, v. 15, suppl. 9, p. 48–57, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910529>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

THE JAPANESE PHARMACOPOEIA. 17a ed. Tokyo: **Society of Japanese Pharmacopoeia** : Distributed by Yakuji Nippo, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10a ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.706-721p.

TRAN, A.; ALBY, K.; KERR, A.; JONES, M.; GILLIGAN, P. H.; MUNSON, E. Cost Savings realized by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2473-2479, 2015. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/53/8/2473.long>>. Acesso em 28 fev. 2017.

USBECK, J. C.; KERN, C. C.; VOGEL, R. F.; BEHR, J. Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted- Laser-Desorption/Ionization–Time- of-Flight Mass Spectrometry (MALDI–TOF MS) in response to varying growth conditions. **Food Microbiology**, n. 36, p. 379-387, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002013001433>>. Acesso em 16 jun 2016.

USP. United States Pharmacopeia. 38a ed. Rockville: **United States Pharmacopeial Convention Inc.**; 2015.

UTESCHER, C. L. A.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R.; GAMBALE, V. Microbiological monitoring of clean rooms in development of vaccines. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 710–6, 2007. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000400023>. Acesso em: 10 out. 2016.

VALENTINE, N.; JOHNSON, T.; SU, Y-F.; FORRESTER, J. Rapid bacterial identification with medical and security applications. **Spie Newsroom**, 2007. Disponível em: <<http://www.spie.org/newsroom/0559-rapid-bacterial-identification-with-medical-and-security-applications>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N. K.; et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin Microbiol Infect.** European Society of Clinical Infectious Diseases, v. 13, suppl. 3, p. 1–46, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x>>. Acesso em: 15 out. 2016.

VAN VEEN, S. Q.; CLAAS, E. C.; KUIJPER, E. J. Highthroughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 900-907, 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/48/3/900.full>>. Acesso em: 14 ago. 2016.

VELOO, A. C.; ERHARD, M.; WELKER, M.; WELLING, G. W.; DEGENER, J. E. Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 58–62, 2011.

VELTEK ASSOCIATES, INC. **Environmental Monitoring**. 2017. Disponível em: <<http://sterile.com/product-category/environmental-monitoring/>>. Acesso em: 30 mai. 2017.

VERMA, J.; SAXENA, S.; BABU, S. G. ELISA-Based Identification and Detection of Microbes. **Analyzing Microbes**, p. 169-186, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-3-642-34410-7_13>. Acesso em: 18 jun. 2017.

WELKER, M.; MOORE, E. R. B. Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 2–11, 2011.

WENNING, M.; SCHERER, S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p. 7111–7120, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00253-013-5087-3.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

WIESER, A.; SCHNEIDER, L.; JUNG, J.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 93, n. 3, p. 965–74, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3783-4>>. Acesso em: 15 out. 2016.

WHO. **Fact sheet on Influenza.** 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>>. Acesso em: 10 out. 2015.

_____. **Vaccines.** 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/influenza/vaccines/about/en/>>. Acesso em: 02 nov. 2015.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology.** 7a ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010, 761p.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 1

Quadro 13. Plano de amostragem da sala limpa 1.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V1	Vestiário de entrada feminino - centro	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V2	Vestiário de entrada masculino - centro	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V3	Próximo a entrada do equipamento 1	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V4	Próximo ao equipamento 2	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V5	Em frente a câmara fria	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V6	Corredor das incubadoras - centro	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V7	Vestiário de saída feminino - centro	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V8	Vestiário de saída masculino - centro	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	S1	Próximo ao equipamento 2	D	Passiva	Mensal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 31. Esboço da planta baixa da sala limpa 1.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE B – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 2

Quadro 14. Plano de amostragem da sala limpa 2.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V1	Próximo ao equipamento 3	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V2	Próximo ao equipamento 4	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V3	Em frente as portas do pass-through no corredor de passagem de carrinhos	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V4	Em frente a autoclave no corredor de passagem de carrinhos	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	S1	Próximo ao equipamento 4	D	Passiva	Mensal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 32. Esboço da planta baixa da sala limpa 2.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE C – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 3

Quadro 15. Plano de amostragem da sala limpa 3.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V1	Em frente a abertura da autoclave localizada na sala de almoxarifado de material estéril 1	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V2	Em frente a abertura da autoclave localizada na sala de preparo	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V3	Em frente a porta de acesso a sala de preparo	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V4	Corredor de acesso a sala de descontaminação	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V5	Em frente a porta de acesso ao corredor da sala de descontaminação	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V6	Em frente a abertura da autoclave localizada na sala de descontaminação	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V7	Em frente a abertura da autoclave localizada na sala de almoxarifado de material estéril 2	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V8	Em frente a porta do pass-through da sala de preparo de material	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V9	Em frente a abertura da autoclave localizada na sala de preparo de material	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 33. Esboço da planta baixa da sala limpa 3.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE D – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 4

Quadro 16. Plano de amostragem da sala limpa 4.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V1	Em frente a porta de acesso a sala de lavagem	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V2	Em frente a porta de acesso a sala de descarte	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V3	Centro da sala de descarte	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 34. Esboço da planta baixa da sala limpa 4.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE E – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 5

Quadro 17. Plano de amostragem da sala limpa 5.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V1	Antecâmara, em frente ao acesso a sala	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V2	Em frente a porta da sala	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Superfície	Sup2	Maçaneta da porta da trampa do lado de dentro da sala	D	De superfície	Mensal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Superfície	Sup3	Centro da trampa	D	De superfície	Mensal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Ar	S1	Canto esquerdo superior da cabine de segurança biológica	C	Passiva	Semanal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Superfície	Sup1	Centro da cabine de segurança biológica	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 35. Esboço da planta baixa da sala limpa 5.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE F – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 6

Quadro 18. Plano de amostragem da sala limpa 6.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V1	Em frente a porta de entrada da sala	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V2	Centro dos reatores, sobre a plataforma	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V3	Em frente a porta do pass-through	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Superfície	Sup1	Porta do pass-through	D	De superfície	Mensal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 36. Esboço da planta baixa da sala limpa 6.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE G – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 7

Quadro 19. Plano de amostragem da sala limpa 7.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V1	Em frente ao pass-through localizado na antecâmara	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	$\leq 100,0$ UFC/placa
Ar	V2	Próximo a porta de entrada	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	$\leq 100,0$ UFC/placa
Ar	V3	Centro da sala	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	$\leq 100,0$ UFC/placa
Ar	S1	Canto superior esquerdo da cabine de segurança biológica 1	C	Passiva	Semanal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	$\leq 50,0$ UFC/placa
Ar	S2	Canto superior esquerdo da cabine de segurança biológica 2	C	Passiva	Semanal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	$\leq 50,0$ UFC/placa
Superfície	Sup1	Maçaneta da porta do pass-through localizado na antecâmara	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup2	Centro do pass-through localizado na antecâmara	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup3	Centro da cabine de segurança biológica 1	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup4	Centro da cabine de segurança biológica 2	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 37. Esboço da planta baixa da sala limpa 7.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE H – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 8

Quadro 20. Plano de amostragem da sala limpa 8.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V1	Antecâmara, em frente a porta de acesso ao corredor de circulação	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Ar	V2	Em frente ao acesso a parte 1 da sala	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Ar	V3	Centro do fluxo laminar	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Ar	V4	Centro da parte 2 da sala	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Ar	S1	Lado superior direito da cabine de segurança biológica	C	Passiva	Semanal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Superfície	Sup1	Centro do fluxo laminar	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup2	Centro da cabine de segurança biológica	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup3	Próximo ao orifício de transferência da parte 2 para a parte 3 da sala	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 38. Esboço da planta baixa da sala limpa 8.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE I – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 9

Quadro 21. Plano de amostragem da sala limpa 9.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Superfície	Sup2	Centro do pass-through 1	D	De superfície	Mensal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Superfície	Sup5	Centro do pass-through 2	D	De superfície	Mensal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Air	V1	Em frente a porta de acesso a sala	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Air	S1	Bancada de preparo de soluções	C	Passiva	Semanal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Superfície	Sup1	Porta do pass-through 1	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup4	Porta do pass-through 2	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup6	Centro do pass-through 3	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup3	Bancada de preparo de soluções	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 39. Esboço da planta baixa da sala limpa 9.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE J – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 10

Quadro 22. Plano de amostragem da sala limpa 10.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V3	Em frente ao pass-through 1, no corredor de circulação	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V4	Em frente a porta de acesso para a sala de lavagem	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V1	Entre o pass-through 3 e a autoclave	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Ar	V2	Em frente a porta de acesso para a sala de preparo de materiais	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Superfície	Sup1	Botão "abrir" do pass-through 3	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup2	Maçaneta da porta do pass-through 3	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup3	Centro do pass-through 2	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup4	Maçaneta da porta do pass-through 2	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup5	Centro do pass-through 1	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 40. Esboço da planta baixa da sala limpa 10.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE K – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 11

Quadro 23. Plano de amostragem da sala limpa 11.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Ar	V1	Antecâmara 4, em frente ao acesso a sala	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V3	Antecâmara 5, em frente ao acesso a sala	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V4	Antecâmara 6, em frente ao acesso a sala	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V9	Antecâmara 1, em frente ao acesso a sala	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V10	Antecâmara 2, em frente ao acesso a sala	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V2	Sala de transferência de produto - centro	D	Ativa	Mensal	100,0-139,0 UFC/m ³	140,0-200,0 UFC/m ³	≤ 200,0 UFC/m ³
Ar	V11	Antecâmara 3, em frente a porta de acesso	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Ar	V5	Vestibário 2, em frente a porta de acesso	B	Ativa	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	5,0 - 6,0 UFC/m ³	7,0 - 10,0 UFC/m ³	≤ 10,0 UFC/m ³
Ar	V6	Corredor que dá acesso a sala de filtração, em frente a porta do vestiário 2	B	Ativa	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	5,0 - 6,0 UFC/m ³	7,0 - 10,0 UFC/m ³	≤ 10,0 UFC/m ³
Ar	V7	Em frente a porta da autoclave	B	Ativa	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	5,0 - 6,0 UFC/m ³	7,0 - 10,0 UFC/m ³	≤ 10,0 UFC/m ³
Ar	V8	Vestibário 3, em frente a porta de acesso	B	Ativa	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	5,0 - 6,0 UFC/m ³	7,0 - 10,0 UFC/m ³	≤ 10,0 UFC/m ³
Superfície	Sup1	Próximo ao local de transferência do produto para o interior do fluxo laminar	B	De superfície	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	3,0 UFC/swab ou placa	4,0 - 5,0 UFC/swab ou placa	≤ 5,0 UFC/swab ou placa
Superfície	Sup4	Botão "abrir" do pass-through 1	B	De superfície	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	3,0 UFC/swab ou placa	4,0 - 5,0 UFC/swab ou placa	≤ 5,0 UFC/swab ou placa
Superfície	Sup5	Maçaneta da porta do pass-through 1	B	De superfície	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	3,0 UFC/swab ou placa	4,0 - 5,0 UFC/swab ou placa	≤ 5,0 UFC/swab ou placa
Superfície	Sup6	Centro do pass-through 1	B	De superfície	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	3,0 UFC/swab ou placa	4,0 - 5,0 UFC/swab ou placa	≤ 5,0 UFC/swab ou placa
Superfície	Sup7	Próximo a porta de saída do pas-through 1	B	De superfície	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	3,0 UFC/swab ou placa	4,0 - 5,0 UFC/swab ou placa	≤ 5,0 UFC/swab ou placa
Superfície	Sup8	Botão "abrir" do pass-through 2	B	De superfície	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	3,0 UFC/swab ou placa	4,0 - 5,0 UFC/swab ou placa	≤ 5,0 UFC/swab ou placa
Superfície	Sup9	Maçaneta da porta do pass-through 2	B	De superfície	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	3,0 UFC/swab ou placa	4,0 - 5,0 UFC/swab ou placa	≤ 5,0 UFC/swab ou placa
Superfície	Sup10	Sobre a bancada de apoio	B	De superfície	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	3,0 UFC/swab ou placa	4,0 - 5,0 UFC/swab ou placa	≤ 5,0 UFC/swab ou placa
Superfície	Sup11	Maçaneta da porta do pass-through 3	B	De superfície	Diariamente (em operação) Semanalmente (em repouso)	3,0 UFC/swab ou placa	4,0 - 5,0 UFC/swab ou placa	≤ 5,0 UFC/swab ou placa
Ar	S1	Centro da bancada no interior do fluxo laminar	A	Passiva	Por lote produzido (em operação) Semanalmente (em repouso)	NA	NA	< 1,0 UFC/ placa
Superfície	Sup2	Centro da bancada no interior do fluxo laminar	A	De superfície	Por lote produzido (em operação) Semanalmente (em repouso)	NA	NA	< 1,0 UFC/ swab ou placa
Superfície	Sup3	Parte interna da cortina que delimita o fluxo laminar	A	De superfície	Por lote produzido (em operação) Semanalmente (em repouso)	NA	NA	< 1,0 UFC/ swab ou placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 41. Esboço da planta baixa da sala limpa 11.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE K – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 12

Quadro 24. Plano de amostragem da sala limpa 12.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Superfície	Sup5	Centro do pass-through 2	D	De superfície	Mensal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Ar	V1	Em frente a porta de acesso a sala de preparo de soluções	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Ar	S1	Canto central direito da cabine de segurança biológica 1	C	Passiva	Semanal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Ar	S2	Canto central direito da cabine de segurança biológica 2	C	Passiva	Semanal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Superfície	Sup1	Centro da cabine de segurança biológica 1	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup2	Centro da cabine de segurança biológica 2	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup3	Maçaneta da porta do pass-through 1	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup4	Maçaneta da porta do pass-through 2	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 42. Esboço da planta baixa da sala limpa 12.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

APÊNDICE L – Plano de amostragem e esboço da planta baixa da sala limpa 13

Quadro 25. Plano de amostragem da sala limpa 13.

Amostra	Pontos	Local	Grau de classificação	Técnica de amostragem	Frequência	Limite de alerta	Limite de ação	Especificação
Superfície	Sup2	Centro do pass-through	D	De superfície	Mensal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Ar	V1	Em frente a porta de acesso a sala	C	Ativa	Semanal	50,0-69,0 UFC/placa	70,0-100,0 UFC/placa	≤ 100,0 UFC/placa
Ar	S1	Canto esquerdo da cabine de pesagem	C	Passiva	Semanal	25,0 - 34,0 UFC/placa	35,0 - 50,0 UFC/placa	≤ 50,0 UFC/placa
Superfície	Sup1	Porta do pass-through	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa
Superfície	Sup3	Centro da cabine de pesagem	C	De superfície	Semanal	13,0 - 17,0 UFC/placa	18,0 - 25,0 UFC/placa	≤ 25 UFC/placa

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

Figura 43. Esboço da planta baixa da sala limpa 13.

Fonte: Adaptado de Fabricante da vacina viral.

ANEXOS

ANEXO A – Currículo Lattes

Laíse de Oliveira Andrade Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6887386717484594 Última atualização do currículo em 21/07/2017
Resumo informado pelo autor	
Possui graduação em Farmácia pela Universidade de Santo Amaro (2012). Foi aprimoranda do Instituto Adolfo Lutz, no Núcleo de Ensaios Físico-químicos em Medicamentos e estagiária de aperfeiçoamento no Laboratório CONFAR, atuando na área de controle microbiológico de qualidade de medicamentos, cosméticos, matérias-primas e produtos para saúde. Atualmente é mestrande em Fármacos e Medicamentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. (Texto informado pelo autor)	
Dados pessoais	
Nome	Laíse de Oliveira Andrade
Nome em citações bibliográficas	ANDRADE, L. O.
Sexo	Feminino
Cor ou Raça	Parda
Filiação	Nestor Teixeira de Andrade e Kízia Rajana de Oliveira Andrade
Nascimento	29/07/1991 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade	354620186 SSP - SP - 30/09/2008
CPF	405.900.228-00
Endereço residencial	Rua Emília Morgado Munhoz Garcia, 17 Vila das Belas - São Paulo 05025-050, SP - Brasil Telefone: 011 981103289 Celular: 011 984324704
Endereço profissional	Lab. de Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos, Contingências, Universidade de São Paulo - Departamento de Farmácia Avenida Prof. Lineu Prestes 500 - Bloco 13 Butantã - São Paulo 05508-900, SP - Brasil Telefone: 11 30913707
Endereço eletrônico	E-mail para contato: laiseandrade09@gmail.com E-mail alternativo laiseandrade@outlook.com
Formação acadêmica/titulação	
2018	Mestrado em Fármacos e Medicamentos Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF - USP, Brasil Título: Métodos rápidos para identificação microbiana aplicados ao monitoramento ambiental de salas limpas: ênfase na tecnologia MALDI-TOF Orientador: Terezinha de Jesus Anselmi Pinto Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Palavras-chave: monitoramento ambiental, identificação microbiana, métodos rápidos, espectrometria de massas, MALDI-TOF Área de conhecimento: Garantia e controle de qualidade farmacêutica
2009 - 2012	Graduação em Farmácia Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil Título: Avaliação da contaminação por enterococos em aliferos (Lactose wafers) comercializadas em supermercados e feiras livres na região sul do município de São Paulo Orientador: Carolina Guilherme Prestes Seydort
2013 - 2014	Aperfeiçoamento em Controle de Qualidade Físico-Químico em Medicament. Instituto Adolfo Lutz, IAL, São Paulo, Brasil Título: Tuberculose pulmonar: Uma discussão do controle de qualidade dos medicamentos tuberculostáticos Orientador: Luis Martin Trujillo Bolsista do(a): Fundação do Desenvolvimento Administrativo
Formação complementar	
2016 - 2016	Curso de curta duração em Business English First Lessons. (Carga horária: 60h) ELS Language Centers, ELS, Estados Unidos
2014 - 2015	Estágio universitário em Controle microbiológico de qualidade de medicamentos e cosméticos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, FCF/USP, Brasil
2015 - 2015	Curso de curta duração em Process Analytical Technology (PAT) e Quality by Design (QbD). (Carga horária: 40h) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, FCF/USP, Brasil
2013 - 2013	Curso de curta duração em Biosegurança Laboratorial. (Carga horária: 30h) Instituto Adolfo Lutz, IAL, São Paulo, Brasil
2011 - 2011	Curso de curta duração em Interações Medicamentosas. (Carga horária: 30h) Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil

- 2011 - 2011 Curso de curta duração em Imunologia Básica – Princípios e Métodos. (Carga horária: 18h).
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil
- 2011 - 2011 Curso de curta duração em A importância da Farmacologia no Controle da Infecção. (Carga horária: 4h).
Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil
- 2011 - 2011 Curso de curta duração em Suporte Básico de Vida. (Carga horária: 4h).
Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil
- 2009 - 2009 Curso de curta duração em Farmácia Clínica. (Carga horária: 4h).
Universidade de Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF

Vínculo Institucional

- 2014 - 2015 Vínculo: Estágio, Enquadramento funcional: Estagiário, Regime: Parcial
Outras informações:
Análises microbiológicas de medicamentos, cosméticos e produtos para saúde no Laboratório CONFAR.

2. Instituto Adolfo Lutz - IAL

Vínculo Institucional

- 2013 - 2014 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Aprendizagem, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. Determinações qualitativas e quantitativas de fármacos utilizando técnicas de titulometria, espectrofotometria, fotometria de chama, cromatografia líquida de alta eficiência e HPLC. Testes de dissolução e de desintegração de medicamentos.

3. Farmácia Galvênia do Capão Redondo Ltda - FARMÁCIA

Vínculo Institucional

- 2012 - 2012 Vínculo: Estágio Supervisionado, Enquadramento funcional: Técnico em Farmácia, Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Pesagem de matérias-primas, manipulação de sachês, óculos e produtos dermatológicos.

4. Laboratório Escola Sanel Industrial de Farmácia da Unisa - LESIFAR

Vínculo Institucional

- 2012 - 2012 Vínculo: Estágio Supervisionado, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 30, Regime: Parcial
Outras informações:
Produção de medicamentos e cosméticos, controle de qualidade físico-químico.

5. Laboratório de Análises São Vicente Ltda - LABORATÓRIO

Vínculo Institucional

- 2011 - 2012 Vínculo: Estágio Supervisionado, Enquadramento funcional: Técnico de laboratório, Carga horária: 15, Regime: Parcial
Outras informações:
Análises bioquímicas automatizadas (Cobas Mira Flux), análises hematológicas automatizadas (Coulter Becton), exame de urina tipo I, urocultura, coprocultura, análises parasitológicas de fezes, V.D.R.L. e testes imunocromatográficos.

6. Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Vínculo Institucional

- 2011 - 2011 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Auxílio nos exames de Antigenemia por Imunofluorescência Indireta para Citomegalovírus e Contagem de Infecções CD4 e CD8 por Citometria de Fluxo.

Áreas de atuação

1. Gerente e controle de qualidade farmacêutica

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escrive Razoavelmente, Lê Bem

Prêmios e títulos

- 2012 Heleno Paulo Minami, Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MARKMAN, B. E. O.; YANO, H. M.; LOMBARDO, M.; MARTINS, V. A. P.; TRUJILLO, L. M.; KOSCHTCHAK, M. R. W.; ANDRADE, L. O.; GRACO, F. M.; ESERIAN, J. K. Atuação no aspecto de medicamentos no comprometimento da eficácia terapêutica. In: VI Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária - SIMBRAVIS, 2013, Porto Alegre. Anais do VI SIMBRAVIS. , 2013. Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://www.eventoscongressos.com.br/simbrevia2013/anais/index_int.php?id_trabalho=1273&area=4&v=6&menu=6
2. YANO, H. M.; PEDRON, C. N.; ANDRADE, L. O.; TRUJILLO, L. M.; MARTINS, V. A. P. Anemia, deficiência nutricional e suplementação de ferro. In: XVII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2013, São Paulo. International Journal of Nutrology. , 2013. Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: impresso
3. YANO, H. M.; PEDRON, C. N.; ANDRADE, L. O.; MARTINS, V. A. P.; TRUJILLO, L. M. Determinação de ferro em suplemento por método clássico espectrofotométrico. In: XVII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2013, São Paulo. International Journal of Nutrology. , 2013. Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: impresso
4. ANDRADE, L. O.; BEYROOT, C. G. P. Avaliação parasitológica de alface (Lactuca sativa) comercializadas na região sul de cidade de São Paulo/SP. In: XVI Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2013, São Paulo. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Nutrologia. , 2012. Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: impresso

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. ANDRADE, L. O.; BEYROOT, C. G. P. Avaliação de contaminação por enteroparasitas em alface (Lactuca sativa) comercializadas em supermercados e feiras livres na região sul de São Paulo/SP. In: XVII Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Análises de Alimentos, 2013, São Paulo. Anais do XVII Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Análises de Alimentos. São Paulo. , 2012. Palavras-chave: Enteroparasitas, alface, hortaliças, supermercados, feiras livres, contaminação. Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Apresentação de trabalho e palestra

1. ANDRADE, L. O.; TRAPLE, M. A. L.; AMARAL, C. M. O.; SILVA, D. C.; GHISLENI, D. D. M.; PINTO, E. J. A. Storage of Items After Moist Sterilization: Validation Process, 2015. (Outra. Apresentação de Trabalho) Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outra: Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Cidade: São Paulo. Evento: XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. 1a Escola de Pesquisadores da USP, 2015. (Seminário)
2. Simpósio de Nanotecnologia Aplicada às Ciências Farmacêuticas, 2016. (Simpósio)
3. Workshop Testes Microbiológicos: Métodos Rápidos, 2016. (Outra)
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2016. (Outra) The influence of cultivation time on identification of isolated microorganisms from cleanroom and water for injection by MALDI-TOF MS.
5. 50ª Semana Universitária Paulista de Farmácia, 2015. (Outra)
6. How to write a scientific article - what should I consider before, 2015. (Outra)
7. I Colóquio RAE, 2015. (Outra)
8. II Fórum de Internacionalização da FmVZ - Objetivos alcançados e desafios futuros, 2015. (Outra)
9. Uso integrado de ferramentas computacionais e ensaios biológicos na descoberta de candidatos a fármacos antitumorais e antileishmanias, 2015. (Outra)
10. Workshop Controle de Contaminação Microbiológica, 2015. (Outra)
11. XIV Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos e Organismos Geneticamente Modificados em Instituições de Ensino e Pesquisa, 2015. (Simpósio)
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2015. (Outra) Storage of Items After Moist Sterilization: Validation Process.
13. Seminários em ciência, tecnologia e inovação do IAL, 2014. (Seminário)
14. Workshop Challenges and Opportunities in Pharmaceutical Development for Neglected Diseases Formulations, 2014. (Outra)
15. Análises Rápidas em Alimentos e Medicamentos com Quantificação por Massa de Alta Resolução (LC/TOF e MS/TOF), 2013. (Seminário)
16. Avanços Recentes em Preparo de Amostras e Inovações em Cromatografia, 2013. (Simpósio)
17. III Simpósio de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, 2013. (Simpósio)

18. Simpósio RENALI - Ensaios de Proficiência e Materiais de Referência - Ferramentas de Garantia da Qualidade Analítica, 2013. (Simpósio)
19. V Ciclo de Palestras do Programa de Aperfeiçoamento Profissional - RAPSSE/FUNDAP, 2013. (Outro)
20. Workshop de Espectrometria Raman Aplicada, 2013. (Outro)
21. Workshop em Controle de Qualidade de Medicamentos e Comitês: Atualização e Tendências, 2013. (Outro)
22. XII Simpósio Internacional da ABRAS de Segurança de Alimentos, 2013. (Simpósio)
23. XVII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2013. (Congresso)
Avaliação parasitológica de eficácia (Lecture active) comercializadas na região sul da cidade de São Paulo/SP
24. Apresentação de Poster / Painel no(s) XVII Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Análises de Alimentos, 2013. (Encontro)
Avaliação de conformação por enteroparasitos em alimentos (Lecture active) comercializadas em supermercados e feiras livres na região sul de São Paulo/SP
25. 12ª Semana Farmacêutica da Unisa, 2012. (Outro)
26. 11ª Semana Farmacêutica da Unisa, 2011. (Outro)
27. 10ª Semana Farmacêutica da Unisa, 2010. (Outro)
28. 9ª Semana Farmacêutica da Unisa, 2009. (Outro)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em atos de eventos	5
Apresentações de trabalhos (Outro)	1

Eventos

Participações em eventos (congresso)	1
Participações em eventos (seminário)	3
Participações em eventos (simpósio)	8
Participações em eventos (encontro)	1
Participações em eventos (outro)	17

ANEXO B – Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 9182212/2 - Laise de Oliveira Andrade

Email: laise.andrade29@gmail.com (favor indicar um email usp.br o mais rápido possível)
Data de Nascimento: 29/07/1991
Cédula de Identidade: RG - 35.462.018-6 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica - Universidade de Santo Amaro - Brasil - 2013

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 03/02/2015
Início da Contagem de Prazo: 03/02/2015
Data Limite para o Depósito: 03/08/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Terezinha de Jesus Andreoli Pinto - 03/02/2015 até o presente. Email: tjapinto@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 03/02/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 09/03/2016
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 03/02/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2017

Impresso em: 21/05/2017 19:50:21

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 9182212/2 - Laise de Oliveira Andrade

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-3/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	12/03/2015	24/06/2015	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5730-7/2	Esterilidade e Potência Microbiológica de Medicamentos	17/03/2015	27/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5816-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Controle de Contaminação Microbiológica: Carga Microbiológica, Biofilme, Desinfetantes e Saneates)	23/03/2015	29/03/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5819-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Tecnologia Analítica de Processo - PAT e Qualidade por Design - QbD)	22/06/2015	30/06/2015	30	2	100	A	N	Concluída
ICB5747-1/1	Proteômica: Um Link entre Biologia, Química, Farmácia e Medicina (Parte I) (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	27/07/2015	09/08/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5712-2/2	Métodos Modernos de Proteômica na Pesquisa em Análises Clínicas e Toxicológicas	10/08/2015	25/09/2015	60	4	100	A	N	Concluída
BIO5706-5/2	Bioinformática na Evolução e nas Filogenias Moleculares (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	10/08/2015	16/11/2015	165	11	100	A	N	Concluída
FBF5779-2/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	04/09/2015	05/11/2015	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728-4/1	Aprimoramento Pedagógico	03/11/2015	30/11/2015	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5709-6/3	Ensaio Pedagógicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/11/2015	08/12/2015	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5776-5/3	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	17/10/2016	30/10/2016	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	40
Estágios:			
Total:	0	25	40

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2017

Impresso em: 21/05/2017 19:50:22