

AMBIENTES CONTROLADOS: O OPERADOR COMO VEICULADOR DE MICRORGANISMOS EM PROCESSOS ASSÉPTICOS

Angelo Máximo Batista de Amorim*
Eunápio Venceslau dos Santos Filho**
José Teixeira de Seixas Filho***
Andréa Pereira de Souza****

RESUMO

A fabricação de produtos assépticos envolve processos rigorosos a fim de manter a integridade do material manipulado. Para alcançar esta qualidade, os laboratórios farmacêuticos têm investido em ambientes controlados cada vez mais eficazes e adotam Programas de Monitoramentos Ambientais (PMA) capazes de monitorar integralmente todo o processo. Além da qualidade destes ambientes, a conduta dos operadores destas áreas deve seguir as normas vigentes descritas no Manual de Boas Práticas de Fabricação (BPF). O objetivo deste trabalho foi demonstrar, por meio de amostragens ativas do ar, que o operador, atuando com condutas inadequadas, veicula microrganismos ou Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de microrganismos, que resultam na contaminação do material manipulado. Realizou-se o monitoramento ativo do ar de salas controladas de um laboratório de uma empresa pública. Foram utilizados amostradores de ar modelo MAS-100, placas de meio de cultura contendo Agar Caseína de Soja e demais materiais devidamente esterilizados. Os monitoramentos ocorreram em quatro momentos distintos durante uma atividade simulada: monitoramento com o operador atuando com condutas adequadas, conforme as normas BPF; monitoramento com o operador atuando com condutas inadequadas; monitoramento com as salas em repouso, 20 minutos após o término da atividade; monitoramento do corredor externo ao laboratório. No monitoramento em que o operador atuou com condutas inadequadas ocorreu a formação de UFC, porém dentro dos limites de aceitação, não sendo suficiente para reprovar o monitoramento, mas foi possível demonstrar que o operador é um contaminador em potencial.

Palavras-chave: Assépticos. Ambientes controlados. Monitoramentos ambientais. Boas práticas de fabricação. Contaminação microbiana.

* Graduado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM), Rio de Janeiro, Brasil. Pós-graduando em Pesquisa Clínica e Pré-clínica pelo Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM), Rio de Janeiro, Brasil. Analista da Qualidade do Instituto de Imunobiológicos (BIO MANGUINHOS/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil
abatista@bio.fiocruz.br

** Graduado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM). Pós-graduando em Ensino de Biociência e Saúde pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil
eunapio@sounisuam.com.br

*** Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Brasil. Professor Titular de Ciências Biológicas e do Mestrado em Desenvolvimento Local do Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM), Rio de Janeiro, Brasil. Pesquisador da Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro (FIPERJ), Rio de Janeiro, Brasil
seixasfilho@yahoo.com.br

****Doutora em Ciências pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil. Coordenadora da Especialização em Pesquisa Clínica e Pré-clínica do Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM), Rio de Janeiro, Brasil. Pesquisadora do Mestrado em Desenvolvimento Local do Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM), Rio de Janeiro, Brasil
andreadesouza@unisuamdoc.com.br

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica vem crescendo a cada ano, evidenciando a necessidade de um controle mais rigoroso em todo o processo de fabricação de seus produtos para evitar contaminações e consequentes perdas de lotes (SBARAI, 2008, p. 7). Uma das principais formas de controle nos processos assépticos destas empresas se dá em um processo chamado Monitoramento Microbiológico Ambiental (MORETTO; CALIXTO, 2011, p. 337). Cada laboratório deve seguir o seu Programa de Monitoramento Ambiental (PMA) de acordo com as exigências da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (SILVA, 2009, p. 3). É o PMA que vai definir como deve ser realizado o monitoramento, contudo ele deve contemplar: amostragem ativa do ar, contagem de partículas não viáveis, plaqueamento das superfícies e operadores envolvidos em processos assépticos. Os ambientes controlados devem ser construídos de forma que o fluxo de ar, temperatura e umidade relativa do ar criem um ambiente inóspito para os microrganismos contaminantes (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004, p. 33-36). Neste contexto, os operadores que atuam nestes ambientes têm influência muito grande nos processos, visto que sua conduta pode provocar turbulências e por consequência gerar partículas capazes de carrear microrganismos aos produtos.

O objetivo deste trabalho foi demonstrar por meio de monitoramentos ativos do ar em um laboratório de uma empresa pública no município do Rio de Janeiro que o operador de ambientes controlados, atuando com condutas inadequadas, é capaz de veicular UFC durante um processo asséptico, podendo levar à contaminação do produto, logo é considerado por diversos autores a maior fonte de contaminação nesses ambientes (UTESCHER *et al.*, 2007, p. 710).

Ressalta-se a importância de seguir as Boas Práticas de Fabricação (BPF) em ambientes controlados, por meio de condutas adequadas do operador, para a manutenção da qualidade e confiabilidade dos produtos processados (MORETTO; CALIXTO, 2011, p. 384).

Este trabalho se limita apenas à amostragem ativa do ar dos ambientes nas seguintes condições: em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas adequadas, especificadas na BPF para ambientes controlados; em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas inadequadas; em repouso, 20 minutos após o término da operação; monitoramento do corredor externo ao laboratório (área não classificada).

2 METODOLOGIA

A metodologia utilizada foi a realização de monitoramentos ativos do ar dos ambientes controlados, com amostrador de ar modelo MAS-100 (Merck) e placas de meio de cultura Agar Caseína de Soja, durante a simulação de uma atividade asséptica. Os monitoramentos foram feitos em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas adequadas, como: movimentos lentos; não falar; não tocar nas superfícies, assim como em sua vestimenta; trocar as luvas periodicamente, conforme descrito nas normas vigentes; em operação com o operador atuando com condutas inadequadas; em repouso, 20 minutos após o término da operação; no corredor externo ao laboratório (área não classificada) para demonstrar a diferença entre uma área classificada e outra não classificada (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004, 2006b).

Para cada ponto monitorado em operação, foram realizadas duas corridas: no início e fim da atividade; para o monitoramento em repouso foi realizado apenas uma corrida por ponto, visto que consistia em verificar a recuperação dos ambientes após uma atividade; para o monitoramento do corredor externo ao laboratório foi monitorado apenas um ponto e somente uma vez.

As etapas dos testes são demonstradas a seguir:

2.1 Entrada do operador na sala limpa

O operador seguiu os procedimentos validados pelo laboratório de metrologia e validação da empresa, segundo as normas da ABNT. A entrada ocorreu pelo *air-lock*¹; a vestimenta² era específica para entrada em sala limpa e continha: capuz, botas e máscaras triplas devidamente esterilizadas, assim como luvas de látex estéreis e óculos de proteção assépticos. Não foi permitida a entrada com joias, cosméticos ou qualquer outro tipo de pertences a fim de evitar contaminações (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2006b, p. 19).

A sala encontrava-se fumigada. Segundo Silva (2009, p. 39), a fumigação é um processo de descontaminação em que o agente é liberado na sua forma gasosa sob pressão atmosférica.

2.2 Separação da placa de meio de cultura para Controle Negativo

Nesta etapa, ocorreu a separação das placas contendo meio de cultura para Controle Negativo (CN). Para cada etapa foi separada uma placa: 01 para o monitoramento em operação (dinâmico), atuando com condutas adequadas; 01 para operação (dinâmico), atuando com condutas inadequadas; 01 para o monitoramento em repouso. Não foi separada uma placa para o monitoramento do corredor. O CN serviu para assegurar a esterilidade do meio de cultura, evitando resultado falso-positivo, ou seja, se gerasse UFC seria realmente resultado do processo. A promoção de crescimento do meio de cultura também era comprovada, evitando resultado falso-negativo, que ocorre quando ele não se encontra nutritivo, logo se não gerasse UFC seria puramente do processo. Em *World Health Organization* (2012) está descrito que o lote utilizado em um monitoramento deve ser o mesmo até o final do processo, e que este deve ter sido esterilizado em um mesmo ciclo de esterilização, tendo a sua promoção de crescimento comprovada. As placas também possuíam neutralizantes, que têm a função de impedir a interferência dos produtos utilizados na sanitização dos ambientes (ABREU, 2003, p. 178; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012, p. 24).

O meio de cultura utilizado foi o Agar Caseína de Soja. Este meio de cultura é utilizado mundialmente por permitir o crescimento tanto de bactérias, quanto de fungos, ou seja, é um meio rico e não seletivo.

¹ O *air-lock* é uma antessala que faz a transição entre a sala de classe 100.000 e a sala de classe 10.000. Possui uma pressão menor que a sala limpa, porém maior que a sala de classe 100.000. As portas são intertravadas, e com visores transparentes justamente para evitar que sejam abertas simultaneamente, desbalanceando a pressão, podendo levar contaminação à sala limpa e consequentemente aos produtos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004, p. 25).

² A vestimenta de sala limpa deve proteger o ambiente e os produtos de possíveis contaminações, seja pela roupa usual ou pelos contaminantes do próprio corpo. A esterilização deste material é realizada em autoclave a 122°C / 32 minutos.

2.3 Monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas adequadas

Esta etapa teve o objetivo de verificar se a boa conduta do operador, seguindo a BPF, geraria um monitoramento satisfatório conforme os critérios de aceitação da ABNT. Segundo a ABNT NBR ISO 14644-5 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2006b, p. 3) monitoramento em operação ou em estado de ocupação é aquele realizado com a presença de operadores em atividade em um ambiente. A *United States Pharmacopeia* (2007, p. 593) cita que para seguir condutas adequadas é necessário manter uma disciplina rigorosa, em que os operadores devem ter conhecimentos específicos sobre princípios biológicos.

Os monitoramentos foram realizados seguindo a cascata de pressão dos ambientes, ou seja, do ambiente de maior para o de menor pressão, ou pode-se dizer também, do ambiente de maior criticidade para o de menor criticidade³. Os ambientes utilizados neste experimento possuíam as seguintes pressões, em pascal (Pa): 36 para a sala limpa (grau C / classe 10.000); 24 para o *air-lock* (grau C / classe 10.000); e 12 sala de produção (grau D / classe 100.000), numa relação 12 Pa de um ambiente para o outro e 0 (zero) no corredor, que é uma área sem classificação, tudo isso para gerar pressão positiva, “soprando” o ar para o ambiente de pressão inferior (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004, p. 15). No equipamento de fluxo unidirecional, a vazão era de 0,45 m/s +/- 20% (grau A / classe 100). O ambiente de grau A é o de maior criticidade, seguido respectivamente dos graus B⁴, C e D (tabela 1) (MORETTO; CALIXTO, 2011, p. 388). Cada classe possui um limite para contaminação microbiológica (tabela 2).

Tabela 1: Comparação entre diferentes sistemas de classificação para áreas limpas, em repouso

OMS-GMP*	Estados Unidos (habitual)	ABNT NBR ISO 14644-1	EC-GMP**
Grau A	Classe 100	ISO 4.8	Grau A
Grau B	Classe 1.000	ISO 5	Grau B
Grau C	Classe 10.000	ISO 7	Grau C
Grau D	Classe 100.000	ISO 8	Grau D

Fonte: Moretto e Calixto (2011, p. 388).

Notas: * OMS-GMP - Organização Mundial de Saúde – *Good Manufacturing Practices* (Boas Práticas de Fabricação).

**EC-GMP – *European Community* (Comunidade Europeia) - *Good Manufacturing Practices* (Boas Práticas de Fabricação).

Tabela 2: Limites para contaminação microbiológica

Grau	Amostragem do ar (UFC/m ³ *)
A	< 1
B	10
C	100
D	200

Fonte: Moretto e Calixto (2011, p. 388).

Notas: *UFC/m³ - Unidades formadoras de colônias por metro cúbico.

³ De acordo com os níveis de criticidade, os ambientes podem ser classificados como Grau A, B, C e D. Tabelas 1 e 2.

⁴ Na empresa não havia nenhuma sala com classificação grau B (classe 1.000), logo não foi possível utilizar no trabalho.

Cada ponto, em cada ambiente, foi monitorado duas vezes, sendo um monitoramento no início da operação e outro ao final do processo. Foram escolhidos para serem monitorados os pontos mais críticos⁵ de cada ambiente.

O operador começou o monitoramento pelo equipamento de fluxo unidirecional (grau A), seguido da sala limpa (grau C), *air-lock* (grau C), sala de produção (grau D). Foi simulada uma atividade de rotina durante o funcionamento do amostrador.

Depois de separada a placa de CN, o operador colocava outra placa com meio de cultura sobre o amostrador de ar, posicionava a tampa perfurada⁶ e em seguida a rosqueava no equipamento, escondendo totalmente a placa com meio de cultura. Programava o amostrador para iniciar automaticamente e simulava a atividade asséptica.

Cada ciclo do aparelho durava 10 minutos, sugando 100 L de ar por minuto (ABREU, 2003, p. 178). A placa de meio de cultura ficava toda demarcada pela pressão do ar que entrava pelo aparelho pelos furos da tampa de alumínio. Segundo Duarte (2009) este processo é chamado “*Sieve Impaction*” ou “Peneira de Impactação”, em que os microrganismos são forçados sobre a superfície do meio de cultura.

No equipamento de fluxo unidirecional (grau A), o amostrador de ar ficou posicionado no seu centro; na sala limpa (grau C), ficou sobre uma bancada de aço inoxidável; no *air-lock* (grau C), ficou sobre um banco de aço inoxidável; na sala de produção (grau D), ficou sobre a bancada central da sala.

Ao final de cada operação do amostrador de ar, as placas de meio de cultura eram retiradas do aparelho, tampadas e seladas nas bordas com dois pedaços de fita de autoclave. Este procedimento evitava que as placas se destampassem e pudessem gerar um resultado falso-positivo.

Após todos os monitoramentos, as placas eram identificadas com etiquetas autocolantes, colocadas nos suportes plásticos e enviadas para o laboratório microbiológico, onde eram incubadas em estufas adequadas, com regulação de temperatura de 22,5°C +/- 2,5°C e de 32,5°C +/- 2,5°C (ABREU, 2003, p. 178; UTSCHER, 2007, p. 711).

A conduta do operador foi um dos pontos mais críticos para esta etapa: evitava movimentos bruscos; não tocava nas superfícies e em seu próprio corpo. Se tocasse nas superfícies ou na vestimenta, deveria realizar a troca das luvas. A *World Health Organization* (2012, p. 27) descreveu que devem ser calçados dois pares de luvas, e o segundo par deve ser trocado com certa frequência.

Outro ponto importante era a abertura das portas, que não podiam ser abertas e fechadas bruscamente e/ou com frequência durante os processos e no repouso, para evitar turbulências no ar (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004, p. 12).

⁵ Pontos críticos são aqueles em que a possibilidade de contaminação é maior (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004, p. 23). Estes pontos foram validados pelo laboratório de metrologia e validação da empresa seguindo as normas vigentes (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2006a, p.2-6).

⁶ A tampa do amostrador era confeccionada em alumínio e possuía furos que permitiam a passagem do ar sugado. O ar passava pela superfície do meio de cultura, proporcionando a aderência de eventuais microrganismos, e posterior crescimento deles.

2.4 Monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas inadequadas

Nesta etapa, o operador realizou os monitoramentos nos mesmos pontos onde foram realizados os anteriores, porém realizando procedimentos incorretos para processos assépticos como: conversar durante o processo; movimentar-se bruscamente; encostar as luvas em diversas superfícies, como na própria vestimenta; abrir e fechar as portas algumas vezes.

Após os monitoramentos as placas foram agregadas e enviadas para a estufa. Esta etapa teve o objetivo de verificar se as condutas inadequadas do operador geravam UFC, conseqüentemente uma contagem microbiológica fora dos padrões aceitáveis pela ABNT (tabela 2), e/ou até mesmo a reprovação do monitoramento.

2.5 Monitoramento em repouso

Esta etapa consistiu em realizar amostragens do ar com os ambientes totalmente livres de turbulências, para verificar a integridade e a recuperação do ar da sala, e não a conduta do operador, etapa essencial para a realização de um monitoramento ambiental.

Os monitoramentos eram realizados 20 minutos após o término da simulação do processo asséptico. O operador programava o aparelho para que ele iniciasse automaticamente após 20 minutos, tempo suficiente para que saísse do ambiente e o ar da sala se recuperasse. Os pontos monitorados foram os mesmos das duas operações anteriores, porém foi realizado apenas um monitoramento por ponto, denominado final do processo. Após os monitoramentos as placas foram agregadas e enviadas para a estufa.

2.6 Monitoramento do corredor externo, anexo ao laboratório (ambiente não controlado)

Este monitoramento teve como objetivo demonstrar a diferença entre um ambiente controlado e um não controlado, logo não possuiu nenhum parâmetro microbiológico de comparação, visto que o corredor não tinha classificação pela ABNT. O corredor possuía apenas condicionamento padrão de ar e umidade. Não possuía filtros microbiológicos e não havia necessidade de vestimentas específicas, apenas a vestimenta padrão de laboratório, como jaleco, blusa e calça (brancos). O amostrador de ar ficou apoiado sobre um armário próximo à porta de entrada principal do laboratório. Foi monitorado um ponto e apenas uma vez. Após o monitoramento a placa foi enviada para a estufa.

2.7 Incubação das placas de meio de cultura

Segundo a *World Health Organization* (2012, p. 29) e Abreu (2003, p. 178), as placas utilizadas em monitoramentos ambientais devem ser incubadas em estufas adequadas em pelo menos duas temperaturas diferentes, em faixas que permitam o crescimento de bactérias e fungos, por um período de 3 a 5 dias. Neste experimento, as placas foram incubadas por 72 horas, com temperatura de 22,5°C +/- 2,5°C, com o objetivo de permitir o crescimento de possíveis bactérias, e em seguida foram transferidas para uma estufa de 32,5°C +/- 2,5°C, por 48 horas, com o objetivo de permitir possível crescimento fúngico (BRASIL, 2010, p. 334).

2.8 Leitura das placas de meio de cultura

As placas foram retiradas das estufas e encaminhadas para a sala de leitura. A ordem de leitura foi: placas do monitoramento em repouso, seguido das placas do monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas adequadas; placas do monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas inadequadas e por último a placa do monitoramento do corredor externo ao laboratório.

3 RESULTADO

Para facilitar a compreensão dos dados obtidos no presente trabalho, os resultados foram divididos nas seguintes subseções: 3.1 Monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas adequadas; 3.2 Monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas inadequadas; 3.3 Monitoramento em repouso; 3.4 Monitoramento do corredor externo ao laboratório (área não controlada).

3.1 Monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas adequadas

O monitoramento satisfatório gerou UFC, mas dentro dos limites de aceitação. Os resultados estão apresentados na tabela 3:

Tabela 3: Resultado do monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas adequadas

Local	Início do processo	Fim do processo	Total	Limite de aceitação **
	UFC/m ³ *	UFC/m ³ *	UFC/m ³ *	UFC/m ³ *
Equipamento de Fluxo Unidirecional	0	0	0	< 1
Sala Limpa	2	0	2	100
<i>Air-lock</i>	3	4	7	100
Sala de produção	17	56	73	200

Fonte: Autores, 2013

Notas: * Unidades formadoras de colônia por metro cúbico.

** Informações da Tabela 2 - Limites para contaminação microbiológica.

3.2 Monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas inadequadas

O monitoramento satisfatório gerou UFC, mas dentro dos limites de aceitação. Os resultados estão apresentados na tabela 4.

AMBIENTES CONTROLADOS: O OPERADOR COMO VEICULADOR
DE MICRORGANISMOS EM PROCESSOS ASSÉPTICOS

Tabela 4: Resultado do monitoramento em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas inadequadas

Local	Início do processo UFC/m ³ *	Fim do processo UFC/m ³ *	Total UFC/m ³ *	Limite de aceitação ** UFC/m ³ *
Equipamento de Fluxo Unidirecional	0	0	0	< 1
Sala Limpa	0	1	1	100
<i>Air-lock</i>	7	7	14	100
Sala de produção	52	67	119	200

Fonte: Autores, 2013

Notas: * Unidades formadoras de colônias por metro cúbico.

** Informações da Tabela 2 - Limites para contaminação microbiológica.

3.3 Monitoramento em repouso

O monitoramento satisfatório gerou UFC, porém dentro dos limites de aceitação, demonstrando a recuperação do ar nos ambientes. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Resultado do monitoramento em repouso

Local	Início do processo UFC/m ³ *	Fim do processo UFC/m ³ *	Total UFC/m ³ *	Limite de aceitação ** UFC/m ³ *
Equipamento de Fluxo Unidirecional	0	0	0	< 1
Sala Limpa	0	0	0	100
<i>Air-lock</i>	0	0	0	100
Sala de produção	0	3	3	200

Fonte: Autores, 2013

Notas: * Unidades formadoras de colônias por metro cúbico.

** Tabela 2 - Limites para contaminação microbiológica.

3.4 Monitoramento do corredor externo ao laboratório (área não controlada)

No monitoramento em repouso foram encontradas 177 UFC, recobrando grande parte da superfície do meio de cultura.

4 DISCUSSÃO

Nos monitoramentos realizados em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas adequadas, alguns pontos apresentaram UFC, demonstrando que mesmo realizando-as durante o processo, o operador foi capaz de gerar UFC, porém dentro dos limites de aceitação; no equipamento de fluxo unidirecional, por exemplo, não houve contaminação em nenhuma das etapas. Este ponto é considerado o mais crítico, e apenas 1 UFC já seria suficiente para reprovar todo o monitoramento ambiental; na sala limpa gerou 2 UFC no início do processo,

sendo 2 colônias de bactérias; no *air-lock* gerou 7 UFC, sendo 3 colônias de bactérias no início do processo e 3 no final, e 1 colônia de fungo também no final do processo. O limite de aceitação para este ambiente é de 100 UFC (MORETTO; CALIXTO, 2011, p. 388); na sala de produção gerou 73 UFC, sendo 16 colônias de bactérias no início do processo, 56 no final, e 1 colônia de fungo no início do processo. O limite de aceitação é de 200 UFC (MORETTO; CALIXTO, 2011, p. 388).

Nos monitoramentos realizados em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas inadequadas, apesar da tentativa de gerar turbulência, houve, em alguns pontos, um aumento na geração de UFC, mas não foi o suficiente para exceder os limites aceitáveis. Não gerou UFC no equipamento de fluxo unidirecional, conforme os outros monitoramentos; na sala limpa gerou 1 colônia de bactérias no final do processo, número menor até que o encontrado na operação realizada com conduta adequada; no *air-lock*, gerou 14 colônias de bactérias, sendo 7 em cada etapa (início e fim).

Ocorreu um aumento na formação de UFC em comparação à operação realizada com condutas adequadas; na sala de produção foram geradas 119 UFC, sendo 49 colônias de bactérias e 3 de fungos no início do processo, e 66 colônias de bactérias e 1 de fungo no final do processo. Este número mais elevado na sala de produção em comparação com o teste em repouso pode ter sido relacionado a diversos fatores, como: tratamento do ar, em que a porosidade dos filtros é maior que nos ambientes da classe acima, e a periodicidade de troca desses filtros que levam a uma recuperação do ar mais demorada; a cascata de pressão das salas, visto que a sala de produção tinha pressão negativa em relação ao *air-lock*, ou seja, ela recebia as fugas de ar do *air-lock*, mesmo a pressão sendo positiva em relação ao corredor. A abertura de portas, por exemplo, pode ter desbalanceado momentaneamente a pressão da sala, suficiente para gerar UFC. Este é o principal motivo de as portas dos laboratórios serem intertravadas: evitar que sejam abertas ao mesmo tempo durante um processo (MORETTO; CALIXTO, 2011, p. 353).

Em relação ao monitoramento em repouso, somente a sala de produção, classificada como grau D, apresentou 3 UFC, sendo que o limite de aceitação para uma sala grau D é de 200 UFC (MORETTO; CALIXTO, 2011, p. 388).

No monitoramento do corredor, o resultado foi surpreendente, pois gerou 177 UFC, abaixo até do limite de aceitação de uma área grau D. Como este corredor não era classificado pela ABNT, era esperado um resultado bem acima dos parâmetros aceitos para ambientes graus D (200 UFC), por exemplo, que era o nível de classificação menos crítico estudado neste trabalho.

Não foi possível realizar a identificação específica dos contaminantes, como as espécies de bactérias e fungos geradoras de UFC neste trabalho, pois o laboratório que realizou a leitura das placas só realizaria esta atividade se o número de UFC excedesse o limite de aceitação do ponto monitorado. A Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010, p. 336) cita que deve ser realizada a quantificação do conteúdo microbiano do monitoramento ambiental de um processo e a identificação dos contaminantes se os limites forem excedidos e/ou em casos em que forem tomadas ações contra reincidentes reprovações, como após processos de sanitização e desinfecção das áreas após intervenções ou quando os ambientes ficarem inutilizados por um longo período. A *United States Pharmacopeia* (2007, p. 593) também cita que não há necessidade de identificar os microrganismos, desde que o ambiente opere dentro dos padrões aceitáveis de UFC.

Apesar de nenhum dos monitoramentos exceder os limites especificados, mesmo com o operador realizando condutas inadequadas em plena operação, os dados obtidos demonstraram que o operador é um contaminador em potencial e que as salas do laboratório onde foi realizado o experimento possuíam um poder de recuperação muito eficiente, demonstrando que o projeto estava dentro das especificações exigidas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004, p. 3-26).

Autores de diversos trabalhos são unânimes em relatar o operador como sendo o maior risco de contaminação em um ambiente controlado, pois geram partículas capazes de servir de meio de transporte para bactérias e fungos, pois os microrganismos carreados pelo ar não são células que flutuam livremente (BRASIL, 2010, p. 331). Utescher *et al.* (2007, p. 710) citam a emissão constante de endógenos por parte do operador; já a *World Health Organization* (2012, p. 4) destaca a pele, as mucosas e as secreções respiratórias. Silva (2009) complementa a lista de possíveis fontes de contaminação com: fios de cabelo, fiapos provenientes da vestimenta, o uso de cosméticos e atividades de escrever. A *United States Pharmacopeia* (2007, p. 590) ressalta a disseminação de microrganismos por indivíduos atuando com infecções ativas.

Na *World Health Organization* (2012, p. 6), ressalta-se a importância de contratar operadores especialistas em ambientes controlados, investir na qualificação dos operadores e seguir as práticas de vestimenta e limpeza pessoal. Segundo Silva (2009, p. 50), quando um operador que realiza atividades em salas limpas tem seu teste de monitoramento de vestimenta ou luvas reprovado por 3 vezes consecutivas, deve-se estudar uma nova atividade para este profissional.

Devido a essa forte correlação entre o operador e a grande possibilidade de contaminação de um produto durante um processo asséptico, algumas indústrias estão investindo em tecnologias alternativas, como por exemplo, os isoladores, que possuem dupla função: proteger o operador de produtos nocivos e proteger o produto durante a operação (FARMACOPEIA AMERICANA, 2007, p. 594; BRASIL, 2010, p. 332).

5 CONCLUSÕES

Quando o operador atuou com condutas inadequadas, em plena operação, foi capaz de gerar UFC, evidenciando que as Boas Práticas de Fabricação são indispensáveis. O resultado preocupa, pois nos monitoramentos em operação (dinâmico), com o operador atuando com condutas adequadas, demonstrou que mesmo seguindo-as, gerou UFC.

CONTROLLED ENVIROMENTS: THE OPERATOR AS CARRIER OF MICROORGANISMS IN PROCESS ASEPTIC

ABSTRACT

The manufacturing of aseptic products involves rigorous processes in order to maintain the integrity of the manipulated materials. To achieve this quality, pharmaceutical companies have invested in controlled environments increasingly effective and adopt *Environmental Monitoral Programs* (EMP) able to fully monitor the entire process. Besides the quality of these environments, the behaviour of operators in these areas must follow the standards described in the *Manual of*

Good Manufacturing Practices (GMP). The aim of this study was to demonstrate, through active sampling of air, that the operators, acting with improper behaviour, conveys microorganisms or *Colony Forming Units (CFU)* of microorganisms, resulting in contamination of manipulated materials. Held active air monitoring of controlled rooms from a public company laboratory. Air samplers Model MAS-100, plates containing culture medium Soybean Casein Agar properly sterilized and other materials were used. The monitoring happened at four different times during a simulated activity: monitoring with the operator acting with appropriate behaviour, according to the standards of the *GMP*; monitoring with the operator acting with improper behavior; monitoring the rooms at rest, 20 minutes after the end of the activity; monitoring the external hall of the laboratory. Monitoring where the operator acted with improper behaviour occurred the formation of CFU, but within the limits of acceptance, not enough to disapprove the monitoring, but it was possible to demonstrate that the operator is a potential contaminant.

Keywords: Aseptics. Controlled environment. Enviromental monitoring. Good manufacturing practices. Microbial contamination.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. S. *et al.* Áreas Limpas: estudo de correlação entre partículas viáveis e não-viáveis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39; n. 2, p. 178, abr./jun. 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 14644-4**. Salas limpas e ambientes controlados associados: parte 4: projeto, construção e partida. Rio de Janeiro, 2004.

_____. **NBR ISO 14644-2**. Salas limpas e ambientes controlados associados: parte 2: especificações para ensaios e monitoramento para comprovar a contínua conformidade com a ABNT NBR ISO 14644-1. Rio de Janeiro, 2006a.

_____. **NBR ISO 14644-5**. Salas limpas e ambientes controlados associados: parte 5: operações. Rio de Janeiro, 2006b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2010. v. 2. p. 331-336.

MORETTO, L. D.; CALIXTO, J. **Boas práticas de fabricação**: guia de autoinspeção na Indústria Farmacêutica. São Paulo: SINDUSFARMA, 2011. v. 8.1.

SBARAI, C. Capacitação em operações. **Revista da SBCC**, São José dos Campos, n. 33, p. 6-10, 2008.

SILVA, J. B. **Programa de monitoramento ambiental**: uma importante ferramenta no controle em processo de Bio-Manguinhos. 2009. 53 f. Monografia (Especialização em Gestão de

AMBIENTES CONTROLADOS: O OPERADOR COMO VEICULADOR
DE MICRORGANISMOS EM PROCESSOS ASSÉPTICOS

Tecnologia em Imunobiológicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments. **Pharmacopeial Forum**, Rockville, v. 31, n. 2, p. 590-594, 2007.

UTESCHER, C. L. A. *et al.* Microbiological Monitoring of Clean Rooms in Development of Vaccines. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 710-711, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental monitoring of clean rooms in vaccine manufacturing facilities**: points to consider for manufacturers of human vaccines. Geneva: WHO, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/env_monitoring_cleanrooms_final.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2014.

Recebido em: 14 maio 2014.

Aprovado em: 06 jun. 2014.