



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

Faculdade de Ciências da Saúde

Curso de Farmácia

Anna Beatriz Gomes da Silva

**Caracterização do perfil microbiológico da unidade de manipulação de
antineoplásicos de um hospital terciário de Brasília**

ARTIGO

Brasília

2019

ANNA BEATRIZ GOMES DA SILVA

**Caracterização do perfil microbiológico da unidade de manipulação de
antineoplásicos de um hospital terciário de Brasília**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de farmácia como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título de
bacharel em Farmácia.

Orientador: Mônica Valero da Silva
Co-orientador: Juliano de Moraes Ferreira
Silva

Brasília

2019

**Caracterização do perfil microbiológico da unidade de manipulação de
antineoplásicos de um hospital terciário de Brasília**

Anna Beatriz Gomes da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de farmácia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Aprovado em: ____ / ____ / _____

Prof. Dra. Mônica Valero da Silva

Orientadora

M.e Dr. Juliano de Moraes Ferreira da Silva

Co-orientador

Prof. Dra. Maria Inês de Toledo

Avaliadora

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	2
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	4
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	8
6. CONCLUSÕES.....	15
7. CONFLITOS DE INTERESSE.....	15
8. AGRADECIMENTOS.....	15
9. REFERÊNCIAS.....	16
10. ANEXOS.....	20

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria de Jesus Gomes da Silva, que esteve presente em todos os momentos da minha vida, me dando forças tanto por exemplos, quanto por palavras. Dedico também a todos os meus professores da graduação, que foram de fundamental importância na construção da minha vida profissional, em especial minha orientadora, Mônica Valero da Silva. À Deus, por ser tão presente e essencial em toda minha vida.

Caracterização do perfil microbiológico da unidade de manipulação de antineoplásicos de um hospital terciário de Brasília

Microbiological profile characterization of the antineoplastic manipulation unit of a tertiary hospital in Brasília

Anna Beatriz Gomes da Silva^{1*}, Marcone de Sousa Soares², Leandro Pereira Bias

Machado², Juliano Morais Ferreira da Silva¹ & Mônica Valero da Silva¹

¹ Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Universidade de Brasília –
Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, Brasil;

² Departamento de Farmácia, Hospital da Criança de Brasília José de Alencar, Brasília,
Distrito Federal, Brasil.

*Autor correspondente: Anna Beatriz Gomes da Silva, e-mail: annabeatriz1607@gmail.com,
Faculdade de Ciências de Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro s/n - Asa Norte,
Brasília - DF, CEP 70910-900, Telefone: (61) 98541-9128

RESUMO

OBJETIVO: este estudo teve como objetivo realizar a caracterização da microbiota da sala limpa na Unidade de Manipulação de Antineoplásicos (UMA) de um hospital terciário de Brasília, a fim de confirmar a qualidade do serviço e sugerir correções a qualquer descumprimento das legislações vigentes. **METODOLOGIA:** a metodologia foi baseada em dois tipos de acompanhamentos: ambiental e operacional. O monitoramento ambiental foi realizado a partir da caracterização da microbiota do ar e das superfícies, em condições de operação e em repouso; e o monitoramento operacional foi realizado a partir da avaliação microbiológica da luva do manipulador. **RESULTADOS/DISCUSSÃO:** Observou-se crescimento microbiológico relacionado a ambos tipos de processo – *in process* e *at rest*, com médias de 6,09 e 1,58 UFC, respectivamente. Encontrou-se uma correlação positiva significativa entre entrada de pessoas e quantidade de medicamentos manipulados com o crescimento microbiano. A maioria dos microrganismos identificados são contaminantes ambientais, entretanto podem se comportar como patógenos oportunistas, causando infecções graves em pacientes imunocomprometidos. **CONCLUSÃO:** este estudo revelou uma alta taxa de contaminação em todos os locais analisados, o que justifica a realização reformas na estrutura da sala limpa e áreas circundantes, objetivando a adequação aos requisitos legislativos.

Palavras-chave: Microrganismos, Boas práticas em manipulação, Antineoplásicos, Sala limpa

ABSTRACT

OBJECTIVE: this study aimed to describe the cleanroom microbiota in the Antineoplastic Manipulation Unit (AMU) of a tertiary hospital in Brasilia, in order to confirm the quality of the service and suggest corrections to any nonconformity when compared to the current legislation. **METHODOLOGY:** The methodology was based on two types of monitoring: environmental and operational. The environmental monitoring was performed with the characterization of the microbiota of the air and the surfaces, in conditions of operation and at rest; the operational monitoring was performed based on the microbiological evaluation of the pharmacist gloves. **RESULTS/DISCUSSION:** A significant difference was noticed in the microbial growth related to the types of process - in operation and at rest, with averages of 6.09 and 1.58 CFUs, respectively. A strong positive correlation was found between microbial growth and both human entries in the cleanroom and amount of compounded drugs. The microorganisms identified were environmental contaminants, however they may behave as opportunistic pathogens, causing serious infections in immunocompromised patients. **CONCLUSION:** this study revealed a high contamination rate in all analyzed sites, which justifies the need for renovations in the structure of the cleanroom and surrounding areas, aiming the conformity to the legislative requirements.

Keywords: Microorganisms, Good manufacturing practices, Antineoplastics, Cleanroom

INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana de produtos injetáveis é um dos problemas mais graves enfrentados atualmente no ambiente hospitalar. Os medicamentos injetáveis contornam várias defesas imunológicas associadas ao sistema gastrointestinal. Portanto, para garantir a esterilidade desses produtos antes da administração ao paciente, hospitais e clínicas devem seguir regulamentos governamentais relativos às boas práticas de manipulação e controle da qualidade. Manter e seguir um programa robusto de controle de qualidade é parte integrante dos padrões de qualidade e atendimento aos requisitos regulamentares (Wilder & Kerrigan, 2012).

Existem muitas fontes de contaminação e os tipos de microrganismos (MO) podem indicar a origem da contaminação. A microbiota no meio ambiente e no produto farmacêutico acabado também pode ser originária de matérias-primas, incluindo água, equipamentos, instalações aéreas, pessoal, ar ambiente e processos de produção, e/ou da embalagem primária do produto (Tršan, Seme, & Srčić, 2019).

A manipulação de produtos não estéreis não envolve tantos critérios rigorosos de assepsia quanto a manipulação de produtos parenterais, cujos riscos de contaminação são mais elevados e suas consequências mais danosas. Este tipo de manipulação apresenta riscos significativos para os pacientes se os requisitos de legislações pertinentes, diretrizes e padrões não forem rigorosamente seguidos durante todo o processo de manipulação.

Ao manipular medicamentos estéreis, o profissional deve obedecer a determinadas legislações e diretrizes pertinentes: como por exemplo o Guia PIC/S de Boas Práticas de Manipulação (PE 009) (Guia PIC/s, 2018), o Capítulo 797 – Manipulação Farmacêutica da Farmacopeia Americana (USP, 2019) e a RDC 220/2004 (Brasil, 2004), que é específica para o serviço de terapia antineoplásica. Estes regulamentos e diretrizes orientam o profissional quanto a definições relacionadas à manipulação de produtos estéreis e

estabelecem requisitos e regulamentos para a aquisição e controle de qualidade da matéria prima, armazenamento, manipulação, fracionamento, conservação, transporte e dispensação de medicamentos manipulados.

Tendo em vista o risco relacionado à manipulação de produtos estéreis, este processo deve ser realizado em ambiente classificado e apropriado para evitar ao máximo contaminações microbianas, ou seja, em áreas denominadas de “sala limpa”. A Farmacopeia Americana define uma sala limpa como: *“uma sala cuja concentração de partículas aéreas é controlada a fim de atender uma determinada classe de limpeza de particulados, cujos microrganismos no ambiente são monitorados de forma que o nível microbiano do ar, superfície e pessoal não excedam uma determinada classe de limpeza”* (USP, 2019). Indústrias, hospitais e clínicas que manufacturam tanto produtos estéreis quanto não estéreis, farmacêuticos e correlatos, são solicitados a demonstrar a eficácia das práticas que empregam para minimizar o risco de contaminação cruzada. Particularmente importante é o monitoramento de processos que se destinam à obtenção de produtos estéreis. O objetivo de um programa de monitoramento é controlar os níveis de microrganismos e de partículas dentro de limites específicos, monitoramento do ar (amostragens ativas e passivas do ar), monitoramento de superfície (*swabs* e placas de contato) e monitoramento de pessoal (avaliação microbiológica da luva) (Pinto, Kaneko e Pinto, 2015).

O programa de monitoramento deve ser preparado em conformidade com as orientações e normas regulatórias atuais, avaliação de riscos e conhecimento dos pontos críticos do processo controlado. Pontos críticos são os locais que representam o maior risco microbiológico para o processo asséptico. Sendo assim, amostras de superfície e de ar devem ser coletadas nos locais e nas fases do processo onde o produto está mais exposto e o risco é, portanto, maior (European Comission Eudralex, 2008).

Este foi um estudo observacional, qualitativo e quantitativo; que teve como objetivo realizar a caracterização da microbiota da sala limpa na Unidade de Manipulação de Antineoplásicos (UMA) de um hospital terciário de Brasília, Brasil, a fim de confirmar a qualidade do serviço e sugerir correções a qualquer descumprimento das legislações vigentes. Este estudo (parecer 3.394.511) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP-FS, UnB) (CAAE 12028919.9.0000.0030). Todos os procedimentos adotados seguem a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

MATERIAIS E MÉTODOS

- LOCAL DO ESTUDO e PERÍODO DE ANÁLISE

O ambiente do Serviço de Terapia Antineoplásica do hospital avaliado é composto por 5 locais: sala administrativa, sala de soluções de grandes volumes e medicamentos, sala de higienização, antecâmara e sala de manipulação. A UMA possui cinco funcionários (três farmacêuticos, quatro auxiliares e uma estagiária) e uma média mensal de oitocentos e cinquenta manipulações. Esta unidade possui cerca de sessenta medicamentos de diversas classes, como por exemplo: agentes alquilantes (ciclofosfamida, dacarbazina), antinmetabólitos (metotrexato, gencitabina, mercaptopurina), compostos de platina (carboplatina, cisplatina), antibióticos (bleomicina, doxorrubicina, dactinomicina), alcaloides (vincristina, vimblastina), entre outros. O estudo foi realizado na sala de manipulação de antineoplásicos, este local é composto por três carrinhos contendo o material a ser utilizado na manipulação (seringas, luvas, agulhas, etc.), um computador, duas cadeiras e a Cabine de Segurança Biológica tipo BII (Veco, Biosafe B2). As amostras foram coletadas diariamente em seis dias da semana, durante processo de manipulação – *in process*; E

durante dois dias em repouso – *at rest*, ou seja, sem que nenhuma pessoa entrasse na sala limpa, totalizando assim oito coletas. A Tabela 1 mostra os locais e as frequências das coletas.

- PRINCÍPIO DAS TÉCNICAS DE MONITORAMENTO

Os métodos escolhidos se baseiam em dois tipos de acompanhamentos: do ambiente e do manipulador. A análise do ambiente foi feita a partir da caracterização da microbiota do ar e das superfícies; e a análise do manipulador foi realizada a partir da avaliação microbiológica da luva. Para o monitoramento ambiental, foram utilizados dois métodos: sedimentação do ar (placas de petri 90 mm) e amostragem de superfície (*swabs*); e para o monitoramento operacional foi utilizada a avaliação microbiológica da luva (*imprinting* da luva em placa de petri).

O método de *swab* foi utilizado para monitorar determinadas superfícies: foi passado um *swab* estéril na superfície analisada, numa amplitude de 24-30 cm (USP, 2019), em seguida este *swab* foi mergulhado em um *falcon* contendo 5 mL de Caldo Caseína de Soja (CCS – Kasvi ®), em seguida foi avaliado se houve ou não crescimento (turvação). O método de sedimentação do ar foi utilizado para coletar amostras do ambiente e consiste em expor uma placa de petri, com meio Ágar Caseína de Soja (ACS – Acumedia®), durante quatro horas (PIC, 2018 e USP, 2019) nos ambientes analisados durante o processo de manipulação (*IN PROCESS*) e sem nenhum processo sendo realizado na sala (*AT REST*). A avaliação microbiológica da luva foi realizada ao pressionar gentilmente os dedos calçados de luva do manipulador na placa de petri contendo o meio ACS. A Tabela 1 descreve os locais e a frequência de coleta das amostras.

TABELA 1 – Locais e Frequência de Coleta

- CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Foi realizada a coloração Gram de determinados microrganismos isolados, a escolha de quais colônias passariam por essa coloração foi feita de acordo com suas

morfologias. Este processo consiste em 5 passos: a. Fixação do material biológico em lâmina, utilizando o bico de bunsen; b. Aplicação do corante primário: cristal violeta, que cora as células em azul/roxo; c. Aplicação da solução mordente de iodo: Lugol; d. Aplicação do agente descolorizante: etanol e por fim; e. Aplicação do contra-corante: Safranina. Após este processo, bactérias Gram negativas coraram de rosa/vermelho e bactérias Gram positivas coraram de azul/violeta (Smith e Hussey, 2005).

A identificação dos microrganismos foi realizada utilizando o sistema Vitek MS, realizada no Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN-DF). O Vitek MS é um sistema de identificação microbiana de espectrometria de massa automatizada que utiliza tecnologia de *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) e um amplo banco de dados de espécies clinicamente relevantes para os resultados em minutos (bioMérieux, 2018).

- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram analisados no programa de análise estatística R versão 3.4.3. As variáveis numéricas foram apresentadas em medida de tendência central e dispersão e as variáveis nominais em números absolutos e proporções.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos *in process* foram realizados nos cinco dias da semana. O único dia da semana em que a coleta se repete é na quarta-feira. Isto foi feito de forma a melhorar a amostragem de dados, uma vez que na primeira quarta-feira não foram atingidos todos os pontos de amostragem. De todos os experimentos, na quarta-feira (experimentos 1 e 6) e na segunda-feira (experimento 2) foram os dias em que houve maior contaminação microbiana, com médias de 6,95; 7,31 e 6,73 unidades formadoras de colônias (UFC), respectivamente.

A menor contagem microbiana foi encontrada nos processos *at rest*: na terça-feira (experimentos 7 e 8), com médias de 2,75 e 0,47 UFC, respectivamente.

Figura 1 Diagrama de caixa, Crescimento microbiológico por experimento

Os locais onde ocorreram o maior índice de crescimento foram nos *pass throughs* (PT), ou seja, na conexão da sala de higienização com a sala limpa (PT.HIG-SL) e da sala limpa com a parte externa de dispensação dos medicamentos (PT.SL_EXT); com uma média de 11,37 e 33,62 UFC, respectivamente. Vale citar que o fluxo de ambos os PT é unidirecional, ou seja, materiais apenas entram na sala limpa no PT.HIG-SL e materiais/produtos finalizados apenas saem através do PT.SL_EXT. O crescimento nos PT deve-se ao fato de que eles fazem a conexão da sala limpa com locais onde não há um controle de partículas, viáveis ou não. No interior da Cabine de Segurança Biológica (CSB_DENTRO), foi o local onde houve o menor crescimento de UFC. A Tabela 2 mostra a média de crescimento microbiano, agrupando os dados por local.

TABELA 2 – Média de Crescimento Microbiano por local

A condição de um ambiente asséptico na área de trabalho da CSB classe II, tipo B2, para manipulação de medicamentos antineoplásicos estéreis deve ser certificada, isto é, o ar de insuflamento deve garantir, em operação, uma classificação da limpeza do ar como ISO classe 5, de acordo com a ISO 14644-1 (ISO, 2015) para partículas de tamanho iguais ou superiores a 0,5 µm e inferiores ou iguais a 5 µm. De acordo com a última validação realizada, em abril de 2019, a Cabine de Segurança Biológica presente na UMA foi classificada como ISO 5. O local onde deve ficar a cabine de segurança biológica classe II, B2, indicada para manipular medicamentos antineoplásicos deve possuir uma classificação de ar ISO classe 7 e pressão diferencial negativa em relação aos ambientes adjacentes, conforme recomenda a RDC 67/07 (ANVISA, 2007) e a Food and Drug Administration (FDA, 2004); e a sala limpa

da UMA não possui nenhum tipo de classificação. A figura 1 mostra o crescimento microbiológico, agrupando os dados por experimento.

Este estudo revelou uma alta taxa de contaminação em todos os locais analisados, principalmente nos pontos críticos, ou seja, aqueles pontos onde existe um maior risco de contaminação (European Commission Eudralex, 2008): locais onde existem uma maior movimentação de pessoas ou locais onde existe um fluxo direto do ar condicionado, como por exemplo os carrinhos que possuem os materiais utilizados para a manipulação. Como a sala limpa é um local ainda não classificado de acordo com as diretrizes citadas acima, este resultado era esperado. Entretanto, a Cabine de Segurança Biológica é classificada como ISO 5 ou Grau A, de acordo os limites recomendados de contaminação presente no guia para boas práticas de manipulação da Convenção de Inspeção Farmacêutica (PIC, 2018), e assim não deve possuir nenhum tipo de crescimento pelos métodos de sedimentação do ar em placas de Petri. Também de acordo com a PIC (2018), no monitoramento operacional, as luvas (mão direita) também não deveriam ter apresentado os níveis de contaminação mostrados neste estudo (>1 UFC). A RDC 220/04 (ANVISA, 2004) estipula que durante o processo de manipulação, devem ser usados dois pares de luvas estéreis, trocados a cada hora ou sempre que sua integridade estiver comprometida. Nem sempre esta rotina é obedecida, o que desta forma contribuiu para a ocorrência da contaminação das luvas.

O crescimento microbiológico também foi comparado entre processos – *at rest* e *in process*. A média de crescimento microbiológico dos experimentos *in process* é de 6,09 UFC e a dos experimentos *at rest* é de 1,58 UFC. Na figura 2, comparam-se estes resultados em um gráfico de caixa (*box plot*).

Figura 2 Diagrama de caixa, comparação entre processos.

Uma grande diferença pode ser notada no crescimento microbiológico relacionado ao tipo de processo – *in process* e *at rest*, este resultado aponta que a entrada e movimentação

de pessoas na sala limpa interfere em suas condições de assepsia. A contaminação em uma sala limpa pode ter origem de diversas fontes, mas a maior fonte de contaminação em uma instalação farmacêutica pode ser rastreada para humanos trabalhando na sala limpa (Sandle, 2014). Isso é evidenciado a partir da associação de microrganismos presentes na pele, sendo os principais isolados do monitoramento ambiental em ambientes controlados (Sandle, 2011). O corpo humano perde um grande número de células da pele e os trajes de sala limpa usados pelo pessoal não podem conter todos os detritos humanos.

A amostragem de superfície (*swabbing*) foi realizada na segunda-feira (experimento 2 – *in process*) e na terça-feira (experimento 7 – *at rest*). No experimento *in process*, apenas dois locais mostraram crescimento microbiano: CAR1 e CAR3. No experimento *at rest*, não houve crescimento microbiano com este método.

Durante o processo de manipulação, os medicamentos são manipulados de acordo com a chegada das prescrições. Sendo assim, o farmacêutico pode entrar algumas vezes dentro da sala limpa para realizar a manipulação dos produtos. Estas variáveis (entrada na sala e quantidade de medicamentos manipulados) foram acompanhadas para todos os experimentos *in process*. Estes dados não foram coletados para os experimentos *at rest* porque neste método não há entrada de pessoas na sala limpa. A figura 3 mostra a relação entre o crescimento microbiológico em UFC com a entrada de pessoas na sala limpa (a) e com a quantidade de medicamentos manipulados (b). O coeficiente de correlação de Pearson entre crescimento microbiológico com entradas é de 0,948 e crescimento microbiológico e medicamentos manipulados é de 0,921 ($p < 0,05$). De acordo com a figura 3 e o dado estatístico da correlação de Pearson, para ambas as variáveis, existe uma correlação positiva muito forte com o crescimento microbiológico, ou seja, quanto maior a entrada de pessoas, ou a quantidade de manipulações, maior o crescimento microbiológico. Novamente, estes resultados apontam para o fato de que, quanto maior a entrada de pessoas, e por consequência

uma maior movimentação humana na sala limpa, maior o nível de contaminação ambiental e operacional.

Figura 3 Relação entre crescimento microbiológico em UFC com a entrada de pessoas (a) e com a quantidade de medicamentos manipulados (b)

Foram realizadas vinte e duas caracterizações por coloração Gram em colônias isoladas de alguns dos experimentos. As colônias foram selecionadas de acordo com o fato de que determinadas morfologias das colônias se repetiam durante os experimentos. Das caracterizações realizadas, 50% foram identificadas como cocos Gram positivos, 27% bacilos Gram positivos, 19% bacilos Gram negativos e 1% cocos Gram negativos. Esses dados são semelhantes aos encontrados na literatura: os microrganismos mais comuns em salas limpas são bactérias Gram-positivas (Utescher et al., 2007). E estes geralmente possuem uma afiliação filogenética próxima, conforme indicado pela análise comparativa de estudos parciais do 16S rDNA, como entre os *Micrococcus* e os *Staphylococcus* (Clarridge 3rd, 2004), ambos microrganismos identificados neste estudo.

Foram realizadas cinco identificações de microrganismos através do sistema Vitek MS. Na sala limpa, foram identificados os MO: *Staphylococcus hominis* e *Paenibacillus lautus*; Na cabine de segurança biológica, foram encontrados: *Bacillus pumilus* e *Micrococcus luteus* e nos carrinhos foram encontrados microrganismos do gênero *Brevibacillus*.

Staphylococcus hominis são cocos Gram positivos, ocorrem geralmente como comensais inofensivos e não patológicos na pele humana em pessoas imunocompetentes. Entretanto, é um patógeno oportunista capaz de causar uma ampla variedade de doenças, incluindo bacteremia, septicemia e endocardite, especialmente em pacientes imunocomprometidos (Soroush et al., 2017). Este microrganismo possui uma subespécie que é resistente a antibióticos: *Staphylococcus hominis* subsp. *Novobiosepticus*,

especialmente perigosa para pacientes com câncer, causando-os septicemia (Hussain Ahmed, Baruah, & Grover, 2017). *Bacillus pumilus* é um bacilo Gram positivo, aeróbio, não-patogênico comumente encontrado no solo. É uma bactéria formadora de esporos, exibindo uma persistência anormalmente alta em ambientes bactericidas. Em seu estado de dormência, é capaz de suportar doses de radiação ultravioleta (UV) ou peróxido de hidrogênio, que são letais para a grande maioria dos microrganismos (Stepanov et al., 2016). E por este fator é utilizada como indicador biológico no processo de esterilização por radiação ionizante (ANVISA, 2010). A espécie *Paenibacillus lautus* é caracterizada como aeróbica ou facultativamente anaeróbica, formada por bastonetes Gram positivos ou Gram variáveis endósporos. As espécies de *Paenibacillus* foram isoladas a partir de uma variedade de fontes incluindo solo, água doce e salgada (Sáez-Nieto et al., 2017). A espécie *Paenibacillus lautus* possui atividade de celulase (Yadav & Dubey, 2018), podendo ser útil na indústria têxtil e alimentícia (Machado de Castro & Nei, 2010). *Micrococcus luteus* é um coco Gram positivo (e Gram variável) encontrada no solo, poeira, água e transitoriamente na pele do ser humano. É comumente utilizada para a detecção de compostos antimicrobianos e pode estar associada à ocorrência de infecções como abscessos, pneumonia, artrite séptica, meningite, bacteremia e choque séptico em pacientes imunocomprometidos (Trabulsi e Alterthum, 2008). Alguns estudos (Sandle, 2011 e Johnson, 2003) mostram que os tipos de microrganismos recuperados de salas limpas são muito semelhantes e geralmente são os seguintes: *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. e leveduras. Essas informações são semelhantes às encontradas neste estudo. A maior parte dos microrganismos identificadas neste estudo são contaminantes ambientais, entretanto, deve-se considerar o tipo de paciente atendido pela instituição estudada: pacientes com câncer, ou seja, pacientes com o sistema imune comprometido (Steele, 2012). E assim, por mais que estes MO sejam classificados como contaminantes ambientais, eles

podem se comportar como patógenos oportunistas (Brown, Cornforth, & Mideo, 2012), podendo causar infecções graves nos pacientes atendidos. Por dificuldades logísticas, não foi possível a identificação de todos os isolados dos monitoramentos ambientais e operacionais.

Como visto nos resultados deste estudo, um dos maiores problemas de contaminação em salas limpas é a movimentação de pessoas. Para minimizar os riscos de contaminação relacionado a pessoas, alguns cuidados devem ser tomados. O pessoal deve estar com vestuário adequado, que deve ser baixo disseminador de partículas, permitir que o corpo respire enquanto aprisiona partículas dentro da roupa, ser flexível o suficiente para um uso confortável e suportar repetidos ciclos de limpeza e esterilização. Além de vestuário adequado, devem ocorrer treinamentos constantes a fim de orientar os colaboradores em tópicos como: introdução aos microrganismos e controle de contaminação microbiológica, entrada e saída de instalações de manipulação, treinamento de higiene pessoal e riscos microbiológicos associados a tarefas de produção específicas (PIC, 2008).

Houve uma quantidade de contaminação significativa em todas as áreas. Contudo, existem dois fatores muito importantes a serem citados neste estudo: primeiro, os medicamentos manipulados nunca ficam expostos ao ar, mesmo dentro da cabine. Os medicamentos injetáveis apresentados em frasco-ampola possuem uma tampa de borracha que permite vedação apropriada com o auxílio de um lacre de alumínio, sendo assim, a dose prescrita é puxada através da seringa diretamente para a bolsa, onde será conectado o equipo para administração ao paciente; o que reduz o risco de contaminação consideravelmente. E segundo, o Serviço de Controle de Infecção (SCI) investiga todas as infecções que acometem os pacientes do hospital, e nenhum caso de infecção já teve como causa reastreada algum processo da UMA.

CONCLUSÕES

Este estudo mostrou uma quantidade significativa de contaminação em ambas as condições – *in process* e *at rest*. Os resultados encontrados apontam para o fato de que a movimentação de pessoas é uma das maiores fontes de contaminação em uma sala limpa. Os microrganismos identificados são patógenos oportunistas, este fato é preocupante porque o público atendido na instituição é de pacientes com câncer, ou seja, imunocomprometidos, e nas atuais condições de assepsia do setor analisado, existe um grande risco de infecção aos pacientes.

Nosso estudo justifica a necessidade de alterações na estrutura do local analisado. Desta forma, em um futuro próximo, o setor irá passar por reformas na sala limpa e áreas circundantes a fim de se adequar aos requisitos presentes nas legislações e diretrizes atuais, tanto nacionais quanto internacionais. Certamente será necessário dar continuidade a mais estudos de avaliação e caracterização para verificar possíveis melhorias, nas condições de assepsia e treinamento dos manipuladores.

CONFLITOS DE INTERESSE

Não há conflitos de interesse envolvidos nesta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Fabiano José Queiroz da Costa, farmacêutico-bioquímico responsável pela Gerência de Biologia Médica, do Laboratório Central do Distrito Federal, pela cessão do uso do equipamento Vitek MS (bioMerieux), para identificação das colônias isoladas a partir do monitoramento ambiental.

REFERÊNCIAS

- Ann C. Smith; Marise A. Hussey. Gram Stain Protocols. *American Society for Microbiology*. 2005. Disponível em: <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.2886>> Acesso em 23 jun. 2019.
- BioMerieux. *VITEK® MS. Microbiology Powered by Mass Spectrometry*. 2018. Disponível em: https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/18_vitekms_v7-digital.pdf Acesso em 23 jun. 2019.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 220, de 21 de setembro de 2004*. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/rdc0220_21_09_2004.html> Acesso em: 23 jun. 2019.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 67, de 8 de outubro de 2007*. Disponível em:< <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/rdc-67-de-8-de-outubro-de-2007>> Acesso em: 23 jun. 2019.
- Brown, S. P., Cornforth, D. M., & Mideo, N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends in Microbiology*. 20(7), 336–342, 2012.
- Comissão da Farmacopeia Brasileira. *Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira*. Volume 1, 5ª edição. Brasília: ANVISA: Fundação Oswaldo Cruz, 2010. 545p.
- Clarridge 3rd, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 17(4), 840–862, 2004.

- European Commission, Eudralex. *Guidelines to good manufacturing practice medicinal products for human and veterinary use, Annex 1: manufacture of sterile medicinal products*. Volume 4. Brussels: European commission. 2008. 16p. Disponível em: <https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2008_11_25_gmp-an1_en.pdf> Acesso em 23 jun. 2019.
- FDA. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry. Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practices*. September 2004. 63p. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/71026/download>>. Acesso em 23 jun. 2019.
- Hussain Ahmed, N., Baruah, F., & Grover, R. K. *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*, an emerging multidrug-resistant bacterium, as a causative agent of septicaemia in cancer patients. In *Indian J Med Res*. 146(3):420-425, 2017.
- ISO. International Organization for Standardization. *ISO 14644-1 Cleanrooms and associated controlled environments - Part 1 Classification of air cleanliness by particle concentration*. Second Edition. Geneva: ISO. 2015. 37p.
- Johnson, S. *Microbiological Environmental Monitoring*. In *Industrial Pharmaceutical Microbiology: Standards and Controls*. Hodges, N.; Hanlon, G. Basingstoke: Euromed Communications. UK, 2003. 399p.
- Machado de Castro, A., Rj, & Nei, B. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. In *Quim. Nova* 33(1): 181-188, 2010.
- PIC. Pharmaceutical Inspection Convention. *Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme: guide to good manufacturing practice for medicinal products*. Annexes PE 009/14. Annex 1: Manufacture of sterile medicinal products. Geneva: PIC/S. 190p,

2018. Disponível em: <<https://www.picscheme.org/layout/document.php?id=1407>>

Acesso em 23 jun. 2019.

Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M. & Pinto, A. F. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. 4ª edição. São Paulo: Ed. Manole, 2015. 416p.

Sáez-Nieto, J. A., Medina-Pascual, M. J., Carrasco, G., Garrido, N., Fernandez-Torres, M. A., Villalón, P. & Valdezate, S. *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. *New Microbes New Infect.* 19, 19–27, 2017.

Sandle, T. People in Cleanrooms: Understanding and Monitoring the Personnel Factor. *Journal of GXP Compliance* (Vol. 18), 2014. Disponível em: <<http://www.ivtnetwork.com/article/people-cleanrooms-understanding-and-monitoring-personnel-factor>> Acesso em 23 jun. 2019

Sandle, T. A Review of Cleanroom Microflora: Types, Trends, and Patterns (Vol. 65). *PDA J Pharm Sci Technol.* 65(4) 392-403, 2012.

Soroush, S., Jabalameli, F., Taherikalani, M., Eslampour, M. A., Beigverdi, R., & Emaneini, M. Characterization of biofilm formation, antimicrobial resistance, and staphylococcal cassette chromosome mec analysis of methicillin resistant *Staphylococcus hominis* from blood cultures of children. *Rev Soc Bras Med Trop.* 50(3): 329-333, 2017.

Steele, R. W. Managing infection in cancer patients and other immunocompromised children. *The Ochsner Journal.* 12(3), 202–210, 2012.

Stepanov, V. G., Tirumalai, M. R., Montazari, S., Checinska, A., Venkateswaran, K., & Fox, G. E. *Bacillus pumilus* SAFR-032 Genome Revisited: Sequence Update and Re-Annotation. *PloS One.* 11(6), e0157331–e0157331, 2016.

Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. *Microbiologia*, 5ª edição. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

- Tršan, M., Seme, K., & Srčić, S. The environmental monitoring in hospital pharmacy cleanroom and microbiota catalogue preparation. *Saudi Pharm J.* 27(4), 455–462, 2019.
- USP. United States Pharmacopeia, National Formulary (USP 42, NF 37). *Chapter <797> Pharmaceutical Compounding – Sterile Preparations*. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention. Vol. 4: 6959-7002p. 2019.
- USP. United States Pharmacopeia, National Formulary (USP 42, NF 37). *Chapter <1116> Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments*. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention. Vol. 5: 7701-7713p. 2019.
- Utescher, C. L. de A., Franzolin, M. R., Trabulsi, L. R., & Gambale, V. Microbiological monitoring of clean rooms in development of vaccines. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 38, pp. 710–716. 2007.
- Wilder, C. N., & Kerrigan, E. The importance of quality control in the production of parenteral drugs. *Am Pharm Rev* (Vol. 15), 2012. Disponível em: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/126885-The-Importance-of-Quality-Control-in-the-Production-of-Parenteral-Drugs/> Acesso em 20 jun. 2019.
- Yadav, S., & Dubey, S. Cellulose degradation potential of *Paenibacillus lautus* strain BHU3 and its whole genome sequence. *Bioresour Technol* 262:124-131, 2018.

ANEXOS

Figura 1 - Crescimento Microbiológico por Experimento

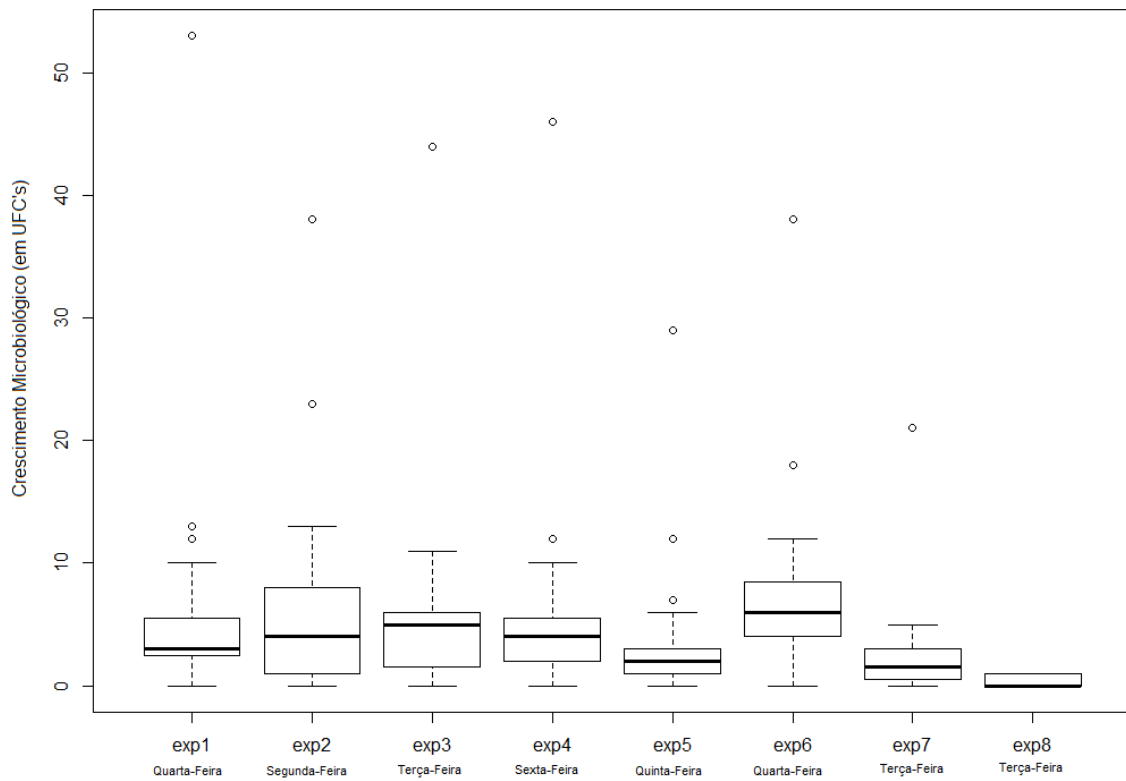


Figura 2 - Crescimento Microbiológico por Tipo de Processo

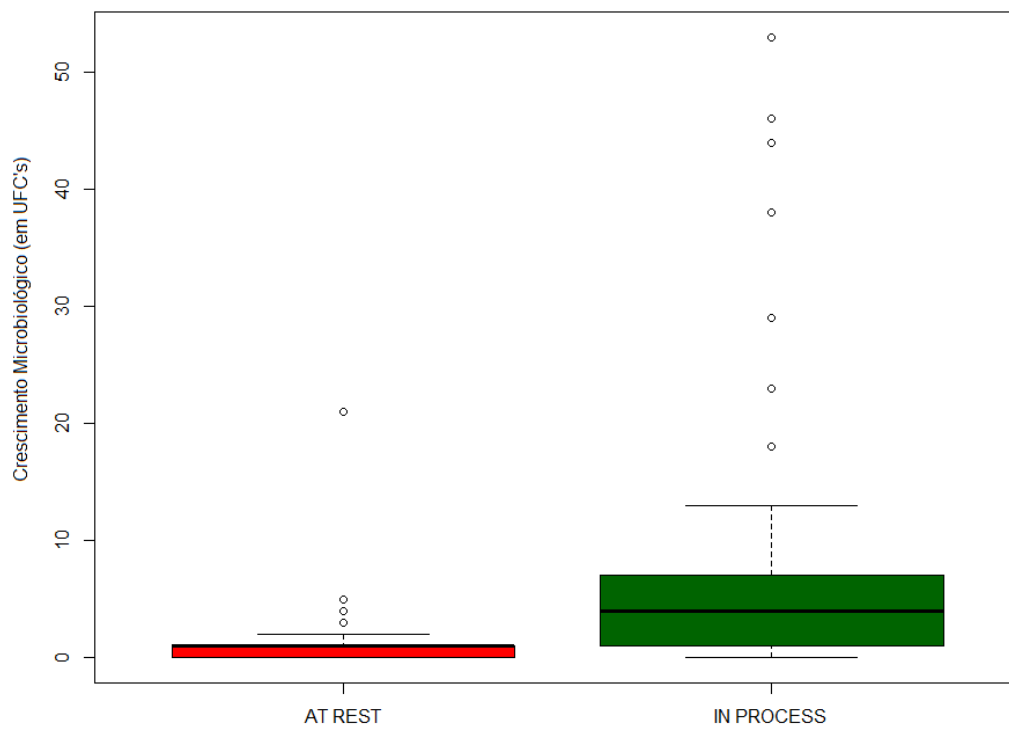


Figura 3 - Relação entre crescimento microbiológico em UFC's com a entrada de pessoas (a) e com a quantidade de medicamentos manipulados (b)

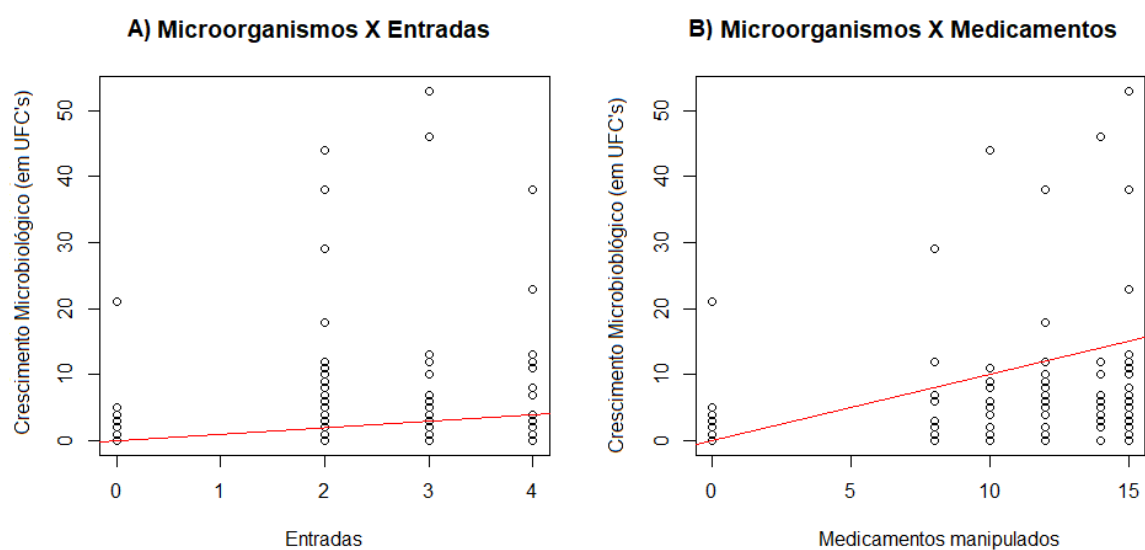


TABELA 1 - Locais e Frequência de Coleta

LOCAL	MNEMÔNICO	MONITORAMENTO	Nº de PLACAS/ coleta	SWABBING
Carrinho 1	CAR1	Ambiental	3	Presente
Carrinho 2	CAR2	Ambiental	3	Presente
Carrinho 3	CAR3	Ambiental	3	Presente
Interior da Cabine de Segurança Biológica	CSB_DENTRO	Ambiental	4	Presente
Teto da Cabine de Segurança Biológica	CSB_TETO	Ambiental	2	Ausente
Chão da Sala Limpa Pass Through	SALA_LIMPA	Ambiental	4	Ausente
Sala de Higienização - Sala Limpa	PT.HIG_SL	Ambiental	1	Ausente
Pass Through Sala de Limpa - Área Externa	PT.SL_EXT	Ambiental	1	Ausente
Luva Mão Esquerda	LUVA_ME	Operacional	1	Ausente
Luva Mão Direita	LUVA_MD	Operacional	1	Ausente

TABELA 2 - Média de Crescimento Microbiano por local

Local	Monitoramento	Média de Crescimento Microbiano (em UFC's)
CAR1	Ambiental	5,25
CAR2	Ambiental	3,21
CAR3	Ambiental	3,21
CSB_DENTRO	Ambiental	1,37
CSB_TETO	Ambiental	2,94
SALA_LIMPA	Ambiental	4,68
PT.HIG_SL	Ambiental	11,37
PT.SL_EXT	Ambiental	33,62
LUVA_ME	Operacional	1,2
LUVA_MD	Operacional	0