

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Paulo Sergio Gomes dos Santos

**PRINCIPAIS GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS PROVENIENTES DAS
ÁREAS CONTROLADAS DA PRODUÇÃO DE IMUNOBIOLOGICOS NO PERÍODO
DE 2005 A 2007**

Rio de Janeiro

2012

Paulo Sergio Gomes dos Santos

PRINCIPAIS GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS PROVENIENTES DAS
ÁREAS CONTROLADAS DA PRODUÇÃO DE IMUNOBIOLOGICOS NO PERÍODO
DE 2005 A 2007

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Dr^a. Silvia Maria Lopes Bricio
Dr^a. Aurea Maria Lage de Moraes

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na Fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Santos, Paulo Sérgio Gomes dos

Principais Gêneros de Fungos Filamentosos Provenientes das Áreas Controladas da Produção de Imunobiológicos no Período de 2005 a 2007. / Paulo Sérgio Gomes dos Santos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

41 f, il, tab.

Monografia (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária) Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

Orientadora: Silvia Maria Lopes Bricio

1. Fungos filamentosos. 2. Imunobiológicos. 3. Áreas controladas. 4. Monitoramento ambiental.

Paulo Sergio Gomes dos Santos

**PRINCIPAIS GÊNEROS DE FUNGOS FILAMENTOSOS PROVENIENTES DAS
ÁREAS CONTROLADAS DA PRODUÇÃO DE IMUNOBIOLOGICOS NO PERÍODO
DE 2005 A 2007**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: 29/10/2012

BANCA EXAMINADORA

Célia Maria Carvalho Pereira Araujo Romão - INCQS

Carlos Roberto Sobrinho do Nascimento - INCQS

Carla de Oliveira Rosas - INCQS

Silvia Maria Lopes Bricio (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional e Controle de Qualidade em Saúde

Aurea Maria Lage de Moraes (Doutora) - Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz

Dedico à minha família e a todos que colaboraram para este trabalho tão importante na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa etapa alcançada na minha vida;

Aos meus pais, (Rosaura) e (Rui) (em memória) que estarão sempre, comigo nas minhas realizações;

Pela paciência minha esposa (Graciana) e meu filho (João Paulo);

Finalizando este trabalho, expresso meus agradecimentos sinceros àquelas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para sua realização, em especial:

- A Silvia Maria Lopes Bricio, minha orientadora, pelas valiosas sugestões, informações e correções durante todo o desenvolvimento deste trabalho;
- A Aurea Maria Lage de Moraes, minha orientadora, pelas informações, empenho e acompanhamento deste trabalho;
- A chefe do Departamento de Controle da Qualidade (DEQUA) Darcy pela liberação e confiança depositada;
- A Lilia Ribeiro Serôdio chefe do Laboratório de Controle da Qualidade (LACOM) pela oportunidade e confiança;
- A Josiane Matoso, chefe da Seção de Esterilidade Processos e Insumos (SEPIN), pela ajuda com informações importantes na elaboração deste trabalho e pela compreensão nos momentos em que fiquei ausente;
- Aos meus colegas do SEPIN, pela colaboração enquanto estive ausente, (Adriana, Aline, Fernanda, Luciane Martins, Luciane Gomes, Nilson, Willian);
- Aos meus colegas do LACOM, Daniele, Carlos José, Beatriz, Daniel, Jaline, pela colaboração e ajuda nos momentos em que tive dúvidas;
- Ao Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz (Renata, Érica e Camila) pela identificação dos fungos e troca de experiências na identificação dos mesmos.

RESUMO

Na produção de imunobiológicos todas as operações técnicas devem ser realizadas em ambientes controlados quanto à sua esterilidade. A não observância deste requisito pode dar origem à contaminação que determina o descarte do produto. O monitoramento ambiental oferece subsídios importantes para a qualidade do ambiente de cada processo asséptico. A determinação quantitativa e qualitativa dos micro-organismos de uma área tem fins informativos para que se saiba o nível de contaminação a ser eliminado, e o mais importante, quais os micro-organismos que compõem a microbiota da área. O objetivo do presente trabalho foi identificar os gêneros dos fungos filamentosos isolados do monitoramento ambiental das áreas controladas da produção de imunobiológicos, no período de 2005 a 2007. Foram selecionados os ambientes de graus B, C e D. As placas provenientes do monitoramento ambiental das áreas selecionadas, pelos métodos ativo e de contato, foram incubadas à temperatura de 25 °C durante 3 a 5 dias. Após a incubação foi realizada a leitura para verificar a presença de crescimento fúngico. A partir de um crescimento observado, foi realizado o repique da colônia para o meio de cultura ágar Batata Dextrose em tubo inclinado; para posterior identificação macro e microscópica das colônias. Foram identificadas 44 unidades formadoras de colônias de fungos filamentosos divididos em quatro gêneros, *Aspergillus* sp, *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp e *Penicillium* sp, sendo que nos três ambientes houve a predominância do gênero *Aspergillus* sp. A identificação dos gêneros dos fungos filamentosos encontrados nas áreas controladas é de suma importância para o conhecimento da microbiota ambiental e a escolha do saneante mais eficaz.

Palavras-chave: Fungos filamentosos. Imunobiológicos. Áreas controladas.

Monitoramento ambiental

ABSTRACT

In the production of immunobiological all technical operations must be conducted in controlled environments for their sterility. Failure to observe this requirement may result in contamination that determine the product disposal. Environmental monitoring provides important support to the environmental quality of each aseptic process. The qualitative and quantitative determination of micro-organisms in an area is for informational purposes so that you know the level of contamination to be eliminated, and most importantly, what are the micro-organisms that make up the microbial flora of the area. The aim of this study was to identify the genera of filamentous fungi isolated from environmental monitoring of controlled areas of immunobiological production in the period 2005 to 2007. Were selected environments grades B, C and D. The plates from the environmental monitoring of selected areas, by active methods of contact were incubated at 25 ° C for 3 to 5 days. Following incubation was performed reading to verify the presence of fungal growth. From a growth observed, inoculation was carried from the colony to the culture medium potato dextrose agar in slant, for further macro and microscopic colonies identification Were identified 44 colony forming units of filamentous fungi divided on four genera, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* and *Penicillium*, and all three environments predominated the genus *Aspergillus*. The identification of the genera of filamentous fungi found in controlled areas is of paramount importance for the knowledge of microbial environmental and choose the most effective disinfectant.

Key-words: Filamentous fungi. Immunobiological. Controlled areas. Environmental monitoring

Lista de Ilustrações e Tabelas

Quadro 1 - Limites de contaminação microbiológica estabelecidos pela RDC nº17 para os diferentes tipos de amostragem de acordo com os diferentes graus de áreas limpas.....	12
Quadro 2 - Comparação entre os diferentes sistemas de classificação para áreas limpas, em repouso.....	13
Quadro 3 - Número máximo de partículas permitido no ar em repouso e em operação de acordo com a classificação da área limpa e com o diâmetro da partícula.	13
Tabela 1 – Níveis de alerta e de ação adotados por Bio-Manguinhos no monitoramento ativo do ar (resultado em UFC/placa).....	15
Tabela 2 – Níveis de alerta e de ação adotados por Bio-Manguinhos no monitoramento passivo do ar (resultado em UFC/placa).....	15
Tabela 3 – Níveis de alerta e de ação adotados por Bio-Manguinhos no monitoramento de amostragem de contato em superfícies limpas e operadores (resultado em UFC/placa).	16
Figura 1 – Amostrador de ar tipo peneira (MAS 100).....	18
Figura 2 – Placa de contato (RODAC).....	19
Quadro 4 – Limite máximo de concentração de partículas não viáveis em metros cúbicos de ar de acordo com o tamanho das partículas segundo a norma ISO 14644-1.....	20
Figura 3 - Instrumento utilizado para Contagem eletrônica de partículas.....	20
Figura 4 – Colônia de <i>Aspergillus</i> sp.....	24
Figura 5 – Conidióforo de <i>Aspergillus</i> sp.....	25
Figura 6 – Colônias de <i>Penicillium</i> sp.	25
Figura 7 – Conidióforo de <i>Penicillium</i> sp.....	26
Figura 8 – Colônia de <i>Fusarium</i> sp.	26
Figura 9 – Conídios de <i>Fusarium</i> sp.	27
Figura 10 – Colônia de <i>Cladosporium</i> sp.	27
Figura 11 – Conidióforo de <i>Cladosporium</i> sp.....	28
Tabela 4 – Gêneros dos fungos filamentosos isolados nas áreas de grau B, C e D nos anos 2005 a 2007.....	33

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Ágar Batata dextrose
BPF	Boas Práticas de Fabricação
EU	Eudralex
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
HVAC	<i>Heating Ventilating, and Air Conditioning</i>
IENT	<i>Institute of Environmental Sciences and Technology</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
LTBBF	Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz
m ³	Metro cúbico
mm	Milímetros
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RODAC	<i>Replicate Organism Direct Agar Contact</i>
SEPIN	Seção de Esterilidade Processos e Insumos
TSA	Ágar tripticaseína de soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USA	Estados Unidos da América
µm	Micrômetro

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO - BPF	11
1.2 ÁREAS LIMPAS E AMBIENTES CONTROLADOS	11
1.3 SISTEMA DE TRATAMENTO DE AR	13
1.4 CERTIFICAÇÃO DE ÁREAS LIMPAS E CONTROLADAS	14
1.5 MONITORAMENTO AMBIENTAL.....	14
1.5.1 Monitoramento Microbiológico.....	16
1.5.2 Amostragem Ativa do Ar.....	17
1.5.3 Amostragem de superfícies (contato).....	18
1.5.4 Contagem eletrônica de partículas.....	19
1.5.5 Media Fill	21
1.6 FUNGOS	21
1.6.1 Fungos filamentosos	22
1.6.1.1 Principais Gêneros de fungos filamentosos encontrados em ambiente	24
1.6.2 Importância dos Fungos.....	28
1.7 JUSTIFICATIVA	30
2 OBJETIVO GERAL	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

Bio-Manguinhos foi criado em quatro de maio de 1976 e inicialmente foi projetado para atender a demanda de pesquisa. O Instituto evoluiu de um conjunto de pequenos laboratórios para um complexo industrial e tecnológico de imunobiológicos, reativos para diagnósticos e biofármacos considerado um dos mais importantes da América do Sul (PONTE, 2007).

Desde 2001, Bio-Manguinhos está qualificado junto à Organização Mundial de Saúde (OMS) para fornecer a vacina contra a Febre Amarela para as Agências das Nações Unidas, além de exportar diretamente para outros países, atendendo ao mercado internacional com a produção excedente (BENEDETTI, 2008).

A qualidade dos imunobiológicos oferecidos à população é um aspecto diretamente relacionado à saúde, para isto é imprescindível que a sua produção atenda aos requisitos da qualidade exigidos pelos organismos reguladores e certificadores nacionais e/ ou internacionais (BENEDETTI, 2008; HOMMA et al, 2003). Estes requisitos incluem normas como a RDC nº 17 de 2010 (BRASIL, 2010), que trata das Boas Práticas de Fabricação (BPF), a NBR ISO 14644-1:2005 (ABNT, 2005), que determina as especificações da limpeza do ar de salas limpas e ambientes controlados, o guia GMP da *Food and Drug Administration* (FDA, 2004), que orienta a produção de medicamentos estéreis e imunobiológicos utilizando processamento asséptico e o capítulo 1116 da Farmacopéia Americana (USP, 2009) que auxilia a avaliação microbiológica de salas limpas e outros ambientes controlados.

Bio-Manguinhos possui, junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), certificação de Boas Práticas de Fabricação para três linhas de produção: vacinas (virais e bacterianas), reativos para diagnóstico e de biofármacos (BENEDETTI, 2008).

1.1 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO - BPF

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) fazem parte da garantia da qualidade e têm a finalidade de assegurar que os produtos sejam consistentemente produzidos e controlados segundo procedimentos adequados e padronizados. A execução das normas de BPF contribui para a diminuição de riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica. Os processos de fabricação devem ser claramente definidos e sistematicamente revisados em decorrência da experiência adquirida. Além disso, devem ser capazes de fabricar medicamentos dentro dos padrões de qualidade exigidos, atendendo às respectivas especificações (BRASIL, 2010).

1.2 ÁREAS LIMPAS E AMBIENTES CONTROLADOS

Na produção de imunobiológicos, todas as operações técnicas devem ser realizadas em ambientes controlados quanto à sua esterilidade. A não observância deste requisito pode dar origem a contaminações que determinam o descarte do produto, impedindo o cumprimento dos compromissos de produção assumidos e alterando a relação de custo prevista (ALMEIDA, 1988).

Salas limpas e ambientes controlados provêm o controle de contaminação por partículas em suspensão no ar em níveis apropriados para realização de atividades sensíveis à contaminação. Produtos e processos que necessitam do controle de contaminação do ar incluem aeroespacial, micro-eletrônica, farmacêuticos, dispositivos e cuidados médicos, alimentos e outros (ABNT, 2005). Para evitar alterações e reduzir qualquer tipo de contaminação, é necessário um nível adequado de sanitização e higiene em todas as etapas do processo (BRASIL 2010).

Área limpa pode ser definida como a área onde o suprimento e a distribuição do ar, sua filtragem, materiais de construção e procedimento de operação visam reduzir a introdução, geração e a retenção de contaminantes em seu interior, atendendo aos níveis apropriados de classificação de acordo com as normas

técnicas vigentes, incluindo equipamentos de fluxo unidirecional (ABNT, 2005; BRASIL, 2010).

As áreas limpas utilizadas na fabricação de produtos estéreis são classificadas em quatro diferentes graus: Grau A: zona de alto risco operacional, como envase e conexões assépticas. Normalmente estas operações devem ser realizadas sob fluxo unidirecional. Os sistemas de fluxo unidirecional devem fornecer uma velocidade de ar homogênea de aproximadamente $0,45 \text{ m/s} \pm 20 \%$ na posição de trabalho; Grau B: áreas circundantes às de grau A para preparações e envase assépticos; Graus C e D: áreas limpas onde são realizadas etapas menos críticas na fabricação de produtos estéreis (BRASIL, 2010).

A RDC nº 17 (BRASIL, 2010) determina os limites de partículas viáveis permitidos nos diferentes graus de áreas limpas de acordo com os tipos de amostragem, sendo expressa em unidades formadoras de colônias (UFC) por metro cúbico (m^3) para amostragem ativa, UFC por até 4 horas para passiva e UFC por placa para contato (Quadro 1).

Quadro 1 - Limites de contaminação microbiológica estabelecidos pela RDC nº17 para os diferentes tipos de amostragem de acordo com os diferentes graus de áreas limpas.

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

Fonte: RDC 17/2010.

A classificação das áreas limpas segundo os graus A, B, C e D é adotada pela OMS-GMP e pela Eudrallex (EUDRALEX, 2008). Nos Estados Unidos é representada por classes 100 a 100.000 (FDA, 2004). A norma NBR ISO 14644-1:2005 (ABNT, 2005) classifica as áreas limpas em diferentes níveis de ISO (1 a 9) e a sua correlação esta disposta no quadro 2 (KRIPPNER, 2010).

Quadro 2 - Comparação entre os diferentes sistemas de classificação para áreas limpas, em repouso.

OMS (GMP)	Estados Unidos (FDA)	NBR ISO 14644-1:2005	EC (GMP)
Grau A	Classe 100	ISO 4,8*	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

*EU guidelines to good manufacturing practice medicinal products for human and veterinarian use. Annex 1 Manufacture of sterily medicinal products. Revisão novembro de 2008.
Fonte: RDC 17/2010

1.3 SISTEMA DE TRATAMENTO DE AR

O sistema de tratamento de ar é fundamental para estabelecer um controle de contaminação adequado. Esse sistema é formado por um conjunto de dispositivos, equipamentos e subsistemas para manter um ambiente com variáveis sob controle, como a pressão das salas, a temperatura e umidade relativa, a velocidade e direção do fluxo do ar no ambiente, a vazão de ar insuflado em relação ao volume do ambiente, a filtração do ar, a contagem de partículas em operação e em repouso, a contenção e extração de pós contaminantes gerados no ambiente e o controle microbiológico e de partículas sedimentadas (NICOLÓSI, 2003).

A RDC 17 (BRASIL, 2010) determina o número máximo de partículas permitido no ar em repouso e em operação (Quadro 3).

Quadro 3 - Número máximo de partículas permitido no ar em repouso e em operação de acordo com a classificação da área limpa e com o diâmetro da partícula.

Grau	Em repouso		Em operação	
	Número máximo de partículas permitido/ m ³		Número máximo de partículas permitido/ m ³	
	≥ 0,5 µm	≥ 5,0 µm	≥ 0,5 µm	≥ 5,0 µm
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: RDC 17/2010

1.4 CERTIFICAÇÃO DE ÁREAS LIMPAS E CONTROLADAS

A certificação é um conjunto de testes capazes de demonstrar que a área limpa ou controlada atende os critérios do projeto (ABREU, 1999). A certificação de áreas limpas deve ser realizada segundo as normas e recomendações de referências como a NBR ISO14644-3:2005 (ABNT, 2005); a IEST-RP-CC-002.09 - desempenho de equipamentos de fluxo unidirecional (IEST, 2009) e a IEST-RP-CC-006.04 - salas e zonas limpas (IEST, 2009) do Instituto de Ciências Ambientais e Tecnologia.

As certificações das salas limpas devem ser realizadas através dos seguintes testes primários: contagem eletrônica de partículas em suspensão no ar; nível de ruído e pressão sonora; estanqueidade da sala; integridade e estanqueidade de filtros absolutos (vazamento de filtros); uniformidade de iluminação; uniformidade de temperatura e umidade relativa do ar em pontos simultâneos; vazamento de ductos e gabinetes dos sistemas de HVAC (*Heating Ventilating, and Air Conditioning*); velocidade e uniformidade do fluxo de ar; vazão, vibração; pressurização; paralelismo; infiltração por indução e partículas sedimentadas (AMEIDA, 2006). A confiabilidade de uma sala limpa depende de verificações da quantidade e qualidade do ar fornecido a cada área e do ajuste metódico do sistema de HVAC funcionando conforme especificações (PINTO, et al 2003).

1.5 MONITORAMENTO AMBIENTAL

Consiste na realização de medições e/ou observações específicas, dirigidas a alguns poucos indicadores e parâmetros, com a finalidade de verificar se determinados impactos ambientais estão ocorrendo, podendo ser dimensionada sua magnitude e avaliada a eficiência de eventuais medidas preventivas adotadas (BITAR; ORTEGA, 1998). O monitoramento ambiental oferece subsídios importantes para a qualidade do ambiente de cada processo asséptico. O resultado de uma

amostra individual deve ser avaliada pelo seu significado em comparação aos níveis de alerta ou de ação. A avaliação pela média de resultados pode mascarar condições inaceitáveis pontuais. Um resultado no nível de alerta requer atenção para não chegar ao nível de ação, porém um resultado no nível de ação necessita de uma investigação mais minuciosa (FDA, 2004).

Os níveis de alerta e de ação adotados por Bio-Manguinhos estão descritos nas tabelas 1 a 3.

Tabela 1 – Níveis de alerta e de ação adotados por Bio-Manguinhos no monitoramento ativo do ar (resultado em UFC/placa).

	Grau A	Grau B	Grau C	Grau D
Satisfatório:	0	1 a 3	1 a 39	1 a 79
Nível de alerta:	NA	4 a 7	40 a 79	80 a 159
Nível de ação:	NA	8 a 10	1 a 39	160 a 200
Insatisfatório:	≥ 1	>10	>100	>200
Invalidado:	Desvios na placa utilizada como controle negativo em conjunto com contaminações nas placas da amostragem passiva ou conforme resultado de investigações.			

NA – Não se aplica; UFC – unidade formadora de colônias.
Fonte: Bio-Manguinhos.

Tabela 2 – Níveis de alerta e de ação adotados por Bio-Manguinhos no monitoramento passivo do ar (resultado em UFC/placa).

	Grau A	Grau B	Grau C	Grau D
Satisfatório:	0	1	1 a 19	1 a 39
Nível de alerta:	NA	2 a 3	20 a 39	40 a 79
Nível de ação:	NA	4 a 5	40 a 50	80 a 100
Insatisfatório:	≥ 1	>5	>50	>100
Invalidado:	Desvios na placa utilizada como controle negativo em conjunto com contaminações nas placas da amostragem passiva ou conforme resultado de investigações.			

NA – Não se aplica; UFC – unidade formadora de colônias.
Fonte: Bio-Manguinhos.

Tabela 3 – Níveis de alerta e de ação adotados por Bio-Manguinhos no monitoramento de amostragem de contato em superfícies limpas e operadores (resultado em UFC/placa).

	Grau A	Grau B	Grau C	Grau D
Satisfatório:	0	1	1 a 9	1 a 19
Nível de alerta:	NA	2 a 3	10 a 19	20 a 39
Nível de ação:	NA	4 a 5	20 a 25	40 a 50
Insatisfatório:	≥ 1	>5	>25	>50
Invalidado:	Desvios na placa utilizada como controle negativo em conjunto com contaminações nas placas da amostragem passiva ou conforme resultado de investigações.			

NA – Não se aplica; UFC – unidade formadora de colônias

Fonte: Bio-Manguinhos.

1.5.1 Monitoramento Microbiológico

A meta do monitoramento microbiológico é verificar a presença de micro-organismos no monitoramento ambiental. A determinação quantitativa e qualitativa dos micro-organismos de uma área tem fins informativos para que se saiba o nível de contaminação a ser eliminado, e o mais importante, quais os micro-organismos que compõem a microbiota da área. Ou seja, oferece um indicativo dos gêneros e/ou espécies de micro-organismos mais frequentemente esperados, que por sua vez proporciona informações vitais para o programa de monitoramento ambiental (FDA, 2004).

O homem é considerado o principal veiculador de partículas, portanto deve ser dispensada uma atenção especial ao treinamento do pessoal que trabalha em áreas limpas, quanto à higiene pessoal e à utilização correta de vestimentas próprias para atividades em áreas controladas (BRASIL, 2010; UTESCHER et al, 2007). Esse treinamento, também, é importante para as pessoas responsáveis pelo programa de monitoramento microbiológico, uma vez que a contaminação da área de trabalho pode ocorrer inadvertidamente durante a amostragem microbiológica, por uso de técnicas impróprias. Em operações altamente automatizadas, o monitoramento pode ser realizado por pessoas que têm contato mais direto com as zonas críticas dentro da área de processamento (BRASIL, 2010). O monitoramento dos funcionários deve ser conduzido antes e depois do trabalho na área de processamento.

Isolados microbianos ambientais geralmente correlacionam com contaminantes encontrados no teste de esterilidade do produto. Em alguns casos, os dados tendem a revelar uma migração de micro-organismo em áreas de processo asséptico de outras áreas menos controladas. A identificação dos micro-organismos nestes ambientes deve ser realizada em intervalos frequentes, para estabelecer um banco de dados atual dos contaminantes presentes nas áreas durante o processamento para demonstrar que os procedimentos de limpeza e sanitização continuam a ser efetivos (FDA, 2004).

O monitoramento microbiológico de ambientes controlados deve incluir a quantificação de micro-organismos do ar ambiental; do ar comprimido que entra na área crítica; das superfícies; dos equipamentos; dos recipientes; dos pisos; das paredes e das vestimentas das pessoas (BRASIL, 2010).

1.5.2 Amostragem Ativa do Ar

Atualmente existem vários tipos de equipamentos comercialmente disponíveis para a realização da quantificação de partículas viáveis do ar. O propósito do procedimento de amostragem ativa é separar as partículas do ar em um local representativo, sem afetar a viabilidade do micro-organismo e sem alterar o padrão do fluxo de ar na região da amostragem (LJUNGQVIST; REINMÜLLER, 2007).

Amostradores por impactação em meios sólidos seccionam um volume conhecido de ar e impactam o mesmo sobre um meio de cultura que é posteriormente incubado e avaliado quanto ao crescimento bacteriano e fúngico. Os amostradores por impactação podem ser divididos em três grupos: analisadores slit-to-agar (BIAP, FH3, R2S), analisadores tipo peneira (Andersen 6-estágios, MAS, SMA) (Figura 1) e analisador centrífugo (RCS Plus) (REINMÜLLER, 2001). Antes de entrar na área de processamento, esse equipamento deve ser devidamente calibrado (FDA, 2004).

Figura 1 – Amostrador de ar tipo peneira (MAS 100)



Fonte: http://www.merckmillipore.com.br/food-analytics/air-monitoring/c_lwGb.s1Lt6IAAAEWC8kfVhTm

1.5.3 Amostragem de superfícies (contato)

A amostragem de superfícies pode ser realizada por placas de toque, compressas, e placas de contato (FDA 2004). As mais utilizadas são as placas RODAC (*replicate organism direct agar contact* – contato direto em ágar para replicação de micro-organismos) que devem ter um abaulamento suficiente para permitir o contato de toda a superfície do ágar com a superfície a ser amostrada (Figura 2) e devem ser utilizadas em superfícies planas como pisos, paredes e equipamentos. O meio de cultura utilizado deve conter agentes inativantes para os possíveis resíduos de agentes sanitizantes e também deve permitir o crescimento de uma ampla gama de micro-organismos. A técnica asséptica do amostrador quando da utilização de placas RODAC é de suma importância, pois o próprio amostrador pode contaminar as placas durante seu manuseio para amostragem (BARONI, 2001).

Figura 2 – Placa de contato (RODAC)



Fonte: http://www.biocendobrasil.com.br/tsa_rodac.asp

1.5.4 Contagem eletrônica de partículas

A contagem eletrônica de partículas é realizada através de um instrumento que funciona com um dispositivo que utiliza um sistema de espalhamento de luz, que exibe ou registra a contagem e tamanhos de partículas discretas no ar (Figura 3). Possui uma capacidade de discriminação para detectar a concentração de partículas de diferentes tamanhos, relativos à classe considerada (BRASIL 2005).

A norma NBR ISO 14644-1:2005 (ABNT, 2005) descreve os diâmetros de partículas medidas em metros cúbicos e suas respectivas classificações para partícula não viáveis (Quadro 4).

Quadro 4 – Limite máximo de concentração de partículas não viáveis em metros cúbicos de ar de acordo com o tamanho das partículas segundo a norma ISO 14644-1.

Classe	Tamanho de partículas					
	$\geq 0,1 \mu\text{m}$	$\geq 0,2 \mu\text{m}$	$\geq 0,3 \mu\text{m}$	$\geq 0,5 \mu\text{m}$	$\geq 1 \mu\text{m}$	$\geq 5 \mu\text{m}$
1	10	2				
2	100	24	10	4		
3	1000	237	102	35	8	
4	10000	2370	1020	352	83	
5	100000	23700	10200	3520	832	29
6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
7				352000	83200	2930
8				3520000	832000	29300
9				35200000	8320000	293000

Fonte: BRASIL/2005

Figura 3 - Instrumento utilizado para Contagem eletrônica de partículas



Fonte: http://www.technilab.com.br/site/metone_3400.asp

1.5.5 Media Fill

Media fill é um teste que simula as operações assépticas em que o produto é substituído por um meio de cultura e serve para assegurar que os processos utilizados são capazes de conduzir a produtos estéreis (BRASIL, 2010). O objetivo do teste é demonstrar a capacidade do processo de manusear produtos de forma estéril e qualificar ou certificar os operadores das áreas controladas, para garantir os requisitos das boas práticas de fabricação (GAYARD, 2002). Para uma nova planta ou processo de produção, a simulação é efetuada como uma parte da validação (PINTO et al, 2003).

Os Pontos críticos na realização do teste *media fill* são: número de recipientes para qualificar o processo asséptico; número de unidades utilizadas no *media fill*; interpretação dos resultados e implementação de ações corretivas. Normalmente três corridas de *media fill* são utilizadas para qualificação inicial, ou para iniciar a produção em uma área. O número mínimo de 3.000 unidades é necessário para a corrida de *media fill* e o total de contaminantes encontrado não pode exceder 0,1%. Plantas-piloto que preparam pequenos lotes podem usar número menor de unidades. Esse é um teste desafiador para o controle de processo, pois as áreas controladas costumam envasar produtos que não favorecem o crescimento microbiano, como antibióticos. Envasar meio de cultura representa para os operadores a ocasião de provar a qualidade de sua técnica asséptica. Representa para os responsáveis da área, desafiar oficialmente o conjunto da produção incluindo operadores, máquinas, sistema de ar condicionado e todos os insumos utilizados (GAYARD, 2002).

1.6 FUNGOS

Os fungos são organismos que estão convivendo conosco todos os dias. Estes organismos são encontrados em qualquer ambiente que nos cerca, incluindo o ar. Estruturas reprodutivas e esporos ou conídios, ao serem depositados em um

substrato adequado, formam novas estruturas vegetativas e reprodutivas. Os fungos são importantes, tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. Ecológicamente, são considerados os lixeiros do mundo, pois degradam todo tipo de restos orgânicos, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas. Já, economicamente, têm implicações em várias áreas: medicina humana e veterinária, farmácia, nutrição, fitopatologia, agricultura, biotecnologia e no controle ambiental (MORAES et al, 2010).

Durante muito tempo os fungos foram classificados como vegetais, e, somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Os fungos são seres eucariotas, ou seja, com organização celular e DNA delimitado por dupla membrana envolvente (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991) e apresentam um conjunto de características próprias que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila, não têm celulose na sua parede celular, exceto alguns fungos aquáticos, não armazenam amido como substância de reserva e não formam tecidos verdadeiros (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). Existem dois tipos de fungos, os filamentosos que são multicelulares e as leveduras que são unicelulares e reproduzem-se por brotamento (RIBEIRO; SOARES, 1993).

1.6.1 Fungos filamentosos

São conhecidos popularmente como mofos ou bolores. Na maioria das vezes, são lembrados por serem causadores de doenças que estão relacionados com algumas espécies, seja parasita de plantas ou causando problemas como alergias e micoses no homem e em animais (SILVA; COELHO, 2006). Encontram-se na natureza através do ar ou por outras vias, como água, insetos, homem e animais. São dispersos através do ar atmosférico e denominados fungos anemófilos. Sendo assim, a microbiota fúngica anemófila pode ser semelhante ou diferente em cada cidade ou região (MEZZARI, 2003).

Os fungos filamentosos apresentam paredes celulares constituídas por quitina ou celulose, ou ambas. São imóveis, em sua maioria, embora possam demonstrar

células vegetativas móveis (BOSSOLAN, 2002). Possuem como elemento constituinte a hifa; o conjunto de hifas é denominado micélio, sua função é vegetativa e reprodutora (RIBEIRO; SOARES, 1993).

Em alguns fungos, o citoplasma da hifa é dividido em intervalos regulares por septos, que são projeções da parede celular, formando compartimentos ou “células” que se comunicam por meio de um pequeno poro septal. Em outros, não existem tais divisões e o citoplasma circula livremente por toda a extensão da hifa. A presença ou ausência dos septos classifica as hifas em septadas ou apocíticas e em asseptadas ou cenocíticas. As hifas também podem ser classificadas de acordo com a pigmentação de sua parede celular. Assim, as hifas transparentes ou incolores são denominadas de hialinas e aquelas de coloração escura (presença de melanina) são chamadas de demáceas (NEUFELD, 1999).

Os esporos dos fungos terrestres são células reprodutivas não móveis, dispersas através do vento ou por animais e, geralmente, produzidos nas hifas aéreas. Este arranjo permite que os esporos sejam "arrastados" por correntes de ar e distribuídos a novas áreas (BOSSOLAN, 2002).

Pode apresentar o fenômeno denominado dicaríofase ou fase dicariótica prolongada, em que a frutificação é composta de hifas binucleadas com presença simultânea de dois núcleos haplóides sexualmente opostos (NEUFELD, 1999).

A identificação de fungos filamentosos por características morfológicas macroscópicas ou microscópicas é muito utilizada e requer experiência por parte do pesquisador, principalmente devido ao fato de que as características dos fungos em desenvolvimento podem mudar consideravelmente dependendo do meio e das condições a que estão expostos. As características macroscópicas e microscópicas podem ser muito semelhantes entre as espécies, podendo levar a resultados errôneos de identificação (FISHER; DOTT, 2002; LUIZ, 2010).

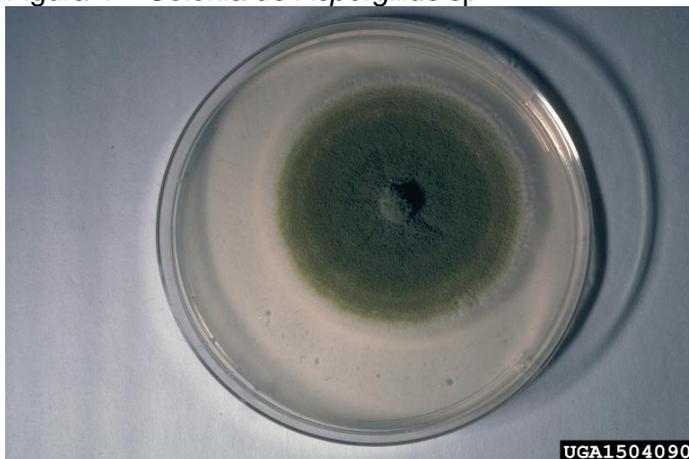
Os ambientes úmidos são fontes de multiplicação fúngica, materiais porosos orgânicos, forros, paredes e isolamentos úmidos; ar externo, interior de condicionadores e dutos sem manutenção. Para manter um controle eficaz de vazamentos, infiltrações e condensação de água deve ser realizada a higienização do ambiente e do sistema de climatização de ar (BRASIL, 2003).

1.6.1.1 Principais Gêneros de fungos filamentosos encontrados em ambiente

Aspergillus spp.

São fungos filamentosos hialinos de crescimento rápido de maior importância quanto à contaminação do ar de recintos fechados (XAVIER et al, 2008). *Aspergillus* spp. estão amplamente distribuídos na natureza; são encontrados no solo, na vegetação em decomposição e em uma variedade de matéria orgânica (KONEMAN et al, 2008). As colônias jovens podem ter uma consistência macia; entretanto com o amadurecimento, a superfície torna-se granular à medida que são produzidos conídios. Certas espécies podem crescer como colônias algodonosas brancas, sendo que a colônia de *A niger*, como o nome indica, apresenta superfície negra (Figura 4). Microscopicamente, as espécies de *Aspergillus* são caracterizadas pela produção de hifas septadas hialinas, uniformes com um segmento hifálico especializado, conhecido como célula pé, que serve como base de origem do conidióforo. Os conidióforos terminam em uma vesícula intumescida, de cuja superfície são transportadas uma ou duas filas de fiálides, dando origem a cadeias de conídios pigmentados (Figura 5) (KONEMAN et al, 2008).

Figura 4 – Colônia de *Aspergillus* sp



Fonte: <http://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1504090>

Figura 5 – Conidióforo de *Aspergillus* sp.

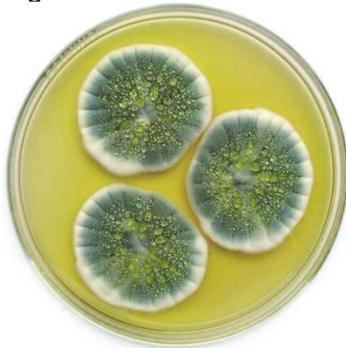


Fonte: Copyright © 2006 Environmental Microbiology Laboratory, Inc.

Penicillium sp.

São fungos amplamente dispersos no ar, associados ao desencadeamento de doenças como alergias respiratórias, asma e rinite (MENEZES; ALCANOFOR; CUNHA, 2006). As colônias de *Penicillium* são granulares, íntegras, em geral com diversas nuances de verde (Figura 6), embora tenham sido encontradas variantes amarelo-acastanhada (KONEMAN et al, 2008). Microscopicamente, o “penicilo” (escova) é produzido pela ramificação do conidióforo em métulas primárias e fiálides secundárias, a partir das pontas nas quais são produzidas as cadeias de conídios (Figura 7). As extremidades das fiálides são rombudas, isto é, parecem cortadas transversalmente (KONEMAN et al, 2008).

Figura 6 – Colônias de *Penicillium* sp.



Fonte: <http://www.microbiologybytes.com/blog/2010/03/17/therapy-for-fungal-diseases/>

Figura 7 – Conidióforo de *Penicillium* sp.



Fonte: <http://pgodoy.com/?gallery=fungos-filamentosos>

Fusarium sp.

É encontrado no solo, nos vegetais em decomposição e frutas maduras no mundo todo. A faixa de pH para seu crescimento pode variar entre 2 a 8, são aeróbios e caso haja redução de oxigênio na atmosfera seu crescimento é retardado. Sua temperatura ótima de crescimento geralmente é em torno de 20 a 30 °C (GOMES, 2003). Possui crescimento rápido, entre 2 a 4 dias, as colônias são algodonosas e apresentam uma superfície magenta, rosa-avermelhada ou púrpura-clara (Figura 8). Dentre os mofos hialinos *Fusarium* spp. são singulares porque produzem micro e macroconídios. O achado de longos macroconídios multicelulares falciformes separados por septos transversais são fundamentais para a identificação de *Fusarium* (Figura 9). Esses macroconídios são, às vezes, descritos como “canoas” ou “barcos” (BOFF, 2011; KONEMAN et al, 2008).

Figura 8 – Colônia de *Fusarium* sp.



Fonte: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_%28hyaline%29/Fusarium/

Figura 9 – Conídios de *Fusarium* sp.



Fonte: http://www.uesb.br/utilitarios/modelos/monta.asp?site=fitopatologia&tex=iii_06_feijao4.html

Cladosporium sp.

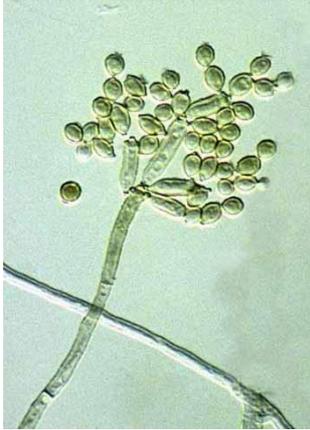
É caracterizado como um fungo ambiental de distribuição universal, sendo um dos gêneros mais citados em estudos de monitoramento ambiental, são facilmente veiculados pelo vento devido ao tamanho reduzido dos conídios (2 a 4 µm) (BOFF, 2011). Os esporos desse fungo, geralmente, são considerados causadores de doenças importantes como alergia, asma e rinite alérgica (MENEZES; ALCANOFOR; CUNHA, 2006). Possuem crescimento moderadamente lento e as colônias possuem textura veludosa de cor verde-oliva escuro a negro (Figura 10). Microscopicamente apresentam filamentos demáceos septados, com conidióforos curtos ou longos, nas extremidades apresentam conídios em cadeia (Figura 11). Os conídios são lisos ou verrucosos, elipsoides ou globosos (BOFF, 2011).

Figura 10 – Colônia de *Cladosporium* sp.



Fonte: <http://pgodoy.com/?gallery=micoses-subcutaneas>

Figura 11 – Conidióforo de *Cladosporium* sp.



Fonte: <http://www.vcharkarn.com/vblog/114955/2>

1.6.2 Importância dos Fungos

Existem espécies fúngicas de grande importância para fabricação de alimentos e fármacos que são utilizadas amplamente na comercialização industrial. Destacam-se os antimicrobianos, penicilina, griseofulvina e cefalosporina (SOUZA, 2009). Na indústria de alimentos, pode ser citada como exemplo a ação fermentativa de leveduras na síntese de álcool etílico e dióxido de carbono, que são imprescindíveis na produção de bebidas como vinho, cerveja e alimentos como pães e massas em geral. Outras espécies de fungos proporcionam sabores e aromas distintos em diferentes tipos de queijos. O consumo de cogumelos comestíveis é uma prática comum entre populações de outros países, principalmente os orientais, e em nosso país, sua utilização vem crescendo a cada dia (SILVA; COELHO, 2006).

Na produção biotecnológica três tipos de fungos são conhecidos pilares da biotecnologia moderna, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces*, são conhecidos por seus impactos positivos quando se referem ao homem (BENNET, 1998). Por outro lado alguns esporos fúngicos podem desenvolver doenças respiratórias alérgicas e a intensidade de exposições pode determinar a relevância clínica (MEZZARI, 2003).

1.6.3 Meios de cultura

Os meios de cultura são soluções de substâncias orgânicas e inorgânicas que, em concentrações adequadas propiciam o crescimento de micro-organismos. A composição e concentração destas soluções vão depender da exigência nutricional do micro-organismo e da finalidade à qual se destina. Meios de cultura em geral permitem o desenvolvimento da maioria dos principais grupos de micro-organismos. No entanto, é importante salientar que não há um meio "universal", que permita a recuperação de qualquer tipo de micro-organismo com elevada eficiência. A composição do meio a utilizar deverá ser, sempre que possível, o mais parecida com as características do ambiente natural dos micro-organismos estudados (SCHULLER, 1998).

Os meios de cultura destinam-se ao cultivo artificial dos micro-organismos. Estes meios fornecem nutrientes indispensáveis para seu crescimento. As exigências nutritivas estão relacionadas a fontes de carbono, nitrogênio, energia e sais minerais. Alguns micro-organismos também necessitam de fatores de crescimento que são substâncias que eles não sintetizam, tais como vitaminas, aminoácidos etc. (RIBEIRO & SOARES, 1993).

O meio de cultura ágar tripticaseína de soja (TSA) é o meio mais utilizado no monitoramento microbiológico de áreas controladas, deve ser adicionado de substâncias neutralizantes para minimizar o efeito dos saneantes utilizados nestas áreas (USP, 2009). Em Biomanguinhos, no monitoramento ambiental ativo e de contato, também é utilizado o meio de cultura TSA.

Para a identificação da microbiota fúngica é necessário a utilização de um meio que facilite a esporulação, neste aspecto o meio de cultura ágar batata-dextrose (BDA) se mostra mais eficiente quando comparado com outros tipos de meios fúngicos (CARNAÚBA, 2007).

1.7 JUSTIFICATIVA

A contaminação por fungos e bactérias em áreas controladas pode determinar o descarte de lotes na produção de imunobiológicos, o conhecimento da microbiota fúngica dessas áreas possibilitará orientar a escolha de um saneante eficiente no processo de sanitização.

2 OBJETIVO GERAL

Verificar os gêneros de fungos filamentosos encontrados no monitoramento ambiental de áreas controladas da produção de imunobiológicos no período de 2005 a 2007.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo foram utilizados os resultados da leitura do monitoramento ambiental realizado durante a produção de imunobiológicos, no período de 2005 a 2007. Foram selecionados três ambientes: salas de grau B - áreas circundantes às de grau A utilizadas na preparação e envase assépticos, operações em cabina de segurança biológica; grau C e D - áreas limpas onde são realizadas etapas menos críticas na fabricação de produtos como entrada de materiais esterilizados e operadores qualificados.

As cepas fúngicas foram obtidas do monitoramento ambiental pelos métodos ativo e de contato de superfícies. O método ativo foi realizado através do instrumento, modelo, MAS 100 (Merck) por um período de 10 minutos com capacidade de amostragem de 1.000 litros de ar. O método de contato utilizou placas RODAC para o contato com a superfície a ser amostrada, por período de tempo de aproximadamente 5 segundos sob leve pressão. Os dois métodos utilizaram nas placas o meio de cultura ágar tripticaseína de soja (TSA) (Biomérieux). As placas foram incubadas à temperatura de 25 °C durante 3 a 5 dias, na Seção de Processos e Insumos (SEPIN) do Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) de Bio-Manguinhos.

Após a incubação das placas foi realizada a leitura para verificar a presença de crescimento fúngico e a contagem das respectivas colônias. A partir de um crescimento observado, foi realizado o repique da colônia para tubos de ensaio contendo os meios ágar batata dextrose (Difco) e ágar extrato de malte (Merck), visando obter uma boa esporulação para posterior identificação macro e microscópica das colônias.

A identificação foi realizada no laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz; de acordo com Barnett e Hunter (1972); Kendrick et al (1980) e McGinnis (1980). As características macroscópicas de cada colônia, como cor, tamanho, textura e reverso, foram observadas através da técnica de ponto de inóculo em placas de Petri e as características microscópicas foram estudadas através da técnica de cultura em lamina (RIVALIER; SEYDELL, 1932).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 2005 a 2007 foram identificadas 44 unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentosos nos três tipos de ambientes, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4 – Gêneros dos fungos filamentosos isolados nas áreas de grau B, C e D nos anos 2005 a 2007.

ANO	GRAU	GÊNERO	UFC*
2005	B	<i>Aspergillus sp.</i>	05
		<i>Cladosporium sp.</i>	04
		<i>Fusarium sp.</i>	04
		<i>Penicillium sp.</i>	13
	C	<i>Aspergillus sp.</i>	02
	D	<i>Aspergillus sp.</i>	02
2006	B	<i>Fusarium sp.</i>	02
	C	<i>Fusarium sp.</i>	01
		<i>Aspergillus sp.</i>	03
	D	<i>Aspergillus sp.</i>	02
2007	B	<i>Aspergillus sp.</i>	03
	C	<i>Aspergillus sp.</i>	01
		<i>Penicillium sp.</i>	02

*UFC – Unidade formadora de colônia

A partir do ano de 2005 foram tomadas algumas medidas preventivas em biomanguinhos, mesmo que o número de colônias encontradas no monitoramento estivesse dentro dos limites aceitáveis pelos órgãos regulatórios. Essas medidas incluíram treinamentos, grupos de investigação, utilização de um rodízio de saneantes a fim de buscar o melhoramento dos processos. Após estas providências houve uma redução na população fúngica das áreas mencionadas como pode ser observado na Tabela 4 onde ocorre uma redução no número de colônias isoladas a partir do ano de 2006.

No presente trabalho foram identificados 44 UFC de fungos filamentosos divididos em quatro gêneros, sendo o mais frequente *Aspergillus* sp., seguido por *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Cladosporium* sp. Resultados superiores foram encontrados por Utescher et al. (2007) que avaliaram o monitoramento ambiental na indústria de imunobiológicos e detectaram 201 UFC de fungos filamentosos no monitoramento ativo do ar nas áreas de classe C e D, sendo que o gênero mais frequente foi *Penicillium* sp., seguido por *Cladosporium* sp. e *Aspergillus* sp. Assim como Almeida et al (1988) que isolaram 64 fungos filamentosos e identificaram 24 gêneros em três ambientes controlados na indústria de imunobiológicos, sendo os mais frequentes *Cladosporium* sp., *Acremonium* sp., *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp

A importância da utilização do amostrador de ar na recuperação de fungos em áreas controladas foi descrito por Távora et al (2003) que compararam dois tipos de amostradores de ar em diferentes áreas de ambiente hospitalar, incluindo áreas controladas. Os autores verificaram que o amostrador tipo peneira de Andersen foi capaz de recuperar 28 diferentes gêneros enquanto o modelo centrífugo RCS, apenas sete, os gêneros mais frequentemente isolados foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* sp.

Bio-Manguinhos utiliza no monitoramento ativo do ar, o amostrador por impactação tipo peneira modelo MAS 100 (Merck). A sua eficiência na recuperação de fungos do ar foi comprovada por Nesa et al (2001) que avaliaram quatro modelos de amostradores de ar por impactação tipo peneira (Samplair, Air test Omega, MAS-100 e BioImpactor) na recuperação de esporos de fungos do ar e verificaram que os modelos Air test Omega, MAS-100 e BioImpactor foram igualmente eficientes.

Reinmüller (2001), realizou um estudo comparativo entre diferentes amostradores de impacto sob condições operacionais simuladas em um ambiente controlado, os diferentes equipamentos foram divididos em três grupos de acordo com os seus princípios: analisadores: slit-to-agar (BIAP, FH3, R2S), analisadores tipo peneira (Andersen 6-estágios, MAS, SMA) e um analisador centrífugo (RCS Plus). O autor verificou que apenas o modelo SMA não apresentou um bom resultado e que os amostradores de ar utilizam diferentes tempos de amostragem e têm eficiência variável em função do tamanho das partículas.

Gangneux et al (2006) realizaram um estudo comparando o desempenho de quatro amostradores de ar por impactação, o MK2 (AES Laboratoires), Air Ideal

(bioMérieux), SAS Super-100 (Fisher Bioblock) e o Mas-100 (Merck), utilizando dois meios de cultura (ágar triptcaseína de soja e ágar extrato de malte) em diferentes áreas de dois hospitais na França. Os autores verificaram que os amostradores MAS-100, MK2 e Air Ideal obtiveram performance semelhante, quanto aos meios de cultura testados, no ágar extrato de malte a contagem de fungos foi o dobro da encontrada no TSA e a identificação também foi facilitada por apresentar melhor esporulação. No presente trabalho foi utilizado o ágar batata dextrose e o ágar extrato de malte para melhorar a esporulação.

Segundo Utescher et al. (2007), os seres humanos são considerados como uma das principais fontes de contaminação em áreas classificadas, e os operadores devem ser analisados pelas suas condutas dentro das áreas, sendo necessário uma qualificação periódica. A não realização deste procedimento pode aumentar a população de micro-organismos dentro dessas áreas e com isso colocar em risco todo o processo.

É imprescindível o conhecimento da microbiota dos ambientes controlados, pois só assim podem-se adotar medidas para evitar que o produto seja comprometido e para esse conhecimento o monitoramento ambiental é de fundamental importância.

Além disso, é importante ressaltar a necessidade de perfeita sintonia dos procedimentos adotados visando atender todos os requisitos da qualidade exigidos por normas nacionais e internacionais para que o objetivo final seja alcançado que é levar à população produto de qualidade.

5 CONCLUSÕES

- No período de 2005 a 2007, foram encontradas 44 UFC de fungos filamentosos nas áreas controladas avaliadas e os principais gêneros identificados foram: *Aspergillus* sp. (18 UFC), *Penicillium* sp. (15 UFC), *Fusarium* sp. (7 UFC) e *Cladosporium* sp. (4 UFC);
- Dentre as três áreas analisadas predominou o gênero *Aspergillus* sp.;
- A identificação dos gêneros dos fungos filamentosos encontrados nas áreas controladas é de suma importância para o conhecimento da microbiota e a escolha de um saneante mais eficaz.

REFERÊNCIAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 14644-1: 2005 – Salas limpas e ambientes controlados associados – Parte 1: Classificação da limpeza do ar. Rio de Janeiro, 2005.
- ALMEIDA, M.E.S. et al. Identificação da Microbiota Fúngica de Ambientes Considerados Assépticos. **Rev. Saúde Pública**, v.22, n.3, p. 201 - 206, 1988.
- ALMEIDA, R.,L., Cuidados que a Indústria Farmacêutica deve ter ao fazer a Qualificação em Sistemas de HVAC para salas limpas. **Revista SBCC**; v..24,p 35 - 41, 2006.
- ABREU,C.,S.,**Áreas Limpas: Estudo de Correlação entre Partículas Viáveis e Não Viáveis**.1991.83 f. Dissertação (Mestrado em Área de Produção Farmacêuticos)-Universidade de São Paulo-Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo,1991.
- BARNETT H.,L., HUNTER B.,B. Illustrated genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company, , 420pp, California,1972.
- BARONI MCVSM. Monitoramento ambiental na manufatura de produtos estéreis. **Revista SBCC**, v.5, p. 14 - 18. 2001.
- BENEDETTI, R.C.E. **Contribuição dos Sistemas da Qualidade: proposta de modelo de gestão da qualidade para Bio-Manguinhos/Fiocruz**. 2008.131 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: bvssp.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=1468 Acesso em janeiro 2012.
- BITAR, O.Y; ORTEGA, R.D. Gestão Ambiental. In: OLIVEIRA, A.M.S.; BRITO, S.N.A. (Eds.). **Geologia de Engenharia**. São Paulo: Associação Brasileira de Geologia e Engenharia (ABGE), cap. 32, p.499-508, 1998.
- BOSSOLAN, N.R.S. **Introdução à Microbiologia**. Universidade de São Paulo, 67 p. São Paulo, 2002. Disponível em: <http://biologia.ifsc.usp.br/bio4/outros/apostila.pdf> Acesso em março de 2012
- BOFF. C.,**Monitoramento de Fungos no Ar de Unidades de Terapia Intensiva**. 2011. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Pneumológicas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/53159/000854130.pdf?sequence=1> Acesso em: maio de 2012
- BRASIL. Resolução - RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003. Determina a publicação de Orientação Técnica elaborada por Grupo Técnico Assessor, sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente

de uso público e coletivo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 jan. 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº. 17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 73, p. 97, 19 abr. 2010. Seção 1.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, vol. 1, p.329-336, 5ª edição, 2010.

CARNAÚBA, J.P.; et al. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, p.199-200, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/sp/v33n2/a18v33n2.pdf> Acesso em: maio de 2012

EUDRALEX – EU Guidelines to Good Manufacturing Practice – Medicinal Products for Human and Veterinary Use – Annex 1 – Manufacture of Sterile Medicinal Products – volume 4, 2008.

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for Industry – Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing – Current Good Manufacturing Practice – September/2004.

FISHER, G.; DOTT, W. Quality assurance and good laboratory practice in the mycological laboratory compilation of basic techniques for the identification of fungi. *International Journal Hygiene Environmental Health*. v.205, n.6, p. 433-442, 2002.

GANGNEUX, J.P. et al. Bacterial and Fungal Counts in Hospital Air: Comparative Yields for 4 Sieve Impactor Air Samplers With 2 Culture Media. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 12, p. 1405-1408, 2006. Disponível em: <http://www.aspergillus.org.uk/secure/articles/pdfs/17152043.pdf> Acesso em: Janeiro 2012.

GAYARD, Y.L.M. Media-Fill para Áreas de Envase Asséptico - Parte II. **Revista SBCC** v.9 p.18-25, 2002. Disponível em: http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2009/09ArtigoTecnico_MediaFill.pdf Acesso em: Maio de 2012.

GOMES, S.;T.;A. Micotoxinas do Fusarium sp Uma Questão Sanitária. Especialização(Curso de Qualidade de Alimentos). Universidade de Brasília.Brasília,2003. Disponível em: http://bdm.bce.unb.br/bitstream/10483/243/1/2003_SosigenesTecioAntonioGomes.pdf, Acesso em: Abril de 2012.

HOMMA, A.; MARTINS, R. M.; JESSOUROUM, E.; OLIVA, O. Desenvolvimento Tecnológico:elo Deficiente na Inovação Tecnológica de Vacinas no Brasil. *História, Ciências, Saúde . Manguinhos*, vol. 10 (suplemento 2): 671-696, 2003.Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/hcsm/v10s2/a11v10s2.pdf>, Acesso em março de 2012.

IEST- Institute of Environmental Sciences and Technology. IEST-RP-CC006-3, IEST-RP-CC-006-04: Testing Cleanrooms. Chicago, 2004.

IEST- Institute of Environmental Sciences and Technology. IEST-RP-CC002-3, IEST-RP-CC-002-09: Unidirectional Flow Clean Devices. Chicago, 2009.

KENDRICK W., B., CARMICHEL J., W., CONNERS J., L., SIGLER L. Genera of Hyphomycetes. The University of Alberta Press, 328pp, Canadá, 1980.

KONEMAN, diagnóstico microbiológico: - texto e atlas colorido. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KRIPPNER, E. Classificação de áreas limpas. **Revista SBCC**, v. 44, p. 42-45, 2010. Disponível em: http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2044/42.classificacao.pdf Acesso em: 16/05/2012.

LACAZ, C. S., PORTO. E., MARTINS, J.E.C., **Micologia Médica**. Fungos Actinomicetos e Algas de Interesse Médico. Ed.8. São Paulo: Savier, p1, 1991.

LJUNGQVIST, B.; REINMÜLLER, B. Biocontaminação do ar em salas controladas – Alguns aspectos dos amostradores de ar. **Revista SBCC**, v. 31, p. 38 – 4, 2007.

MENEZES, E., A., ALCANOFOR, A., C., CUNHA, F., A., Fungos anemófilos na sala de periódicos da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará, **Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC)**, v. 38, n. 3, p 155-158, 2006. Disponível em: http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_38_03/rbac3803_05.pdf Acesso em: abril, 2012.

MEZZARI, A.; et al. Os Fungos Anemófilos e Sensibilização em Indivíduos Atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista da Associação Médica Brasileira** v.49, n. 3, p. 270-273, 2003.

MORAES, A., M., L., PAES, R., A., HOLANDA, V., L., Introdução à Micologia. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde, v.04 Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz, p399-496, 2010.

MCGINNIS, M., R. Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York: Academic Press, 286 p, 1980.

NEUFELD, P.M. **Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico**. 1.ed. Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1999.

NESA, D. et al. Comparative performance of impactor air samplers for quantification of fungal contamination. **Journal of Hospital Infection**, v.47, p. 149 – 155, 2001.

NICOLOSI, M. Boas Práticas de Engenharia são as melhores estratégias para atender Boas Práticas de Fabricação. **Revista SBCC**. v. 49, p. 12-18, 2003.

PINTO, J.,T.,J.,A.,KANEKO.,T.,M.,OHRA,M.,T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. p-22-133. 2ª edição, São Paulo: Atheneu, 2003.

PONTE,C.F., Bio-Manguinhos 30 anos: a trajetória de uma instituição pública de ciência e tecnologia. **Cadernos de História da Ciência – Instituto Butantan**. v 3, p 35-138, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/chci/v3n1/v3n1a03.pdf> Acesso em: 01/06/2012.

REINMÜLLER, B. Algumas observações sobre estudos comparativos de amostradores ativos de ar. **Revista SBCC**, v.2, p. 16-19, 2001.

RIBEIRO,M.C.;SOARES,M.M.S.R. **Microbiologia Prática Roteiro e Manual Bactérias e Fungos**. Campinas:,Atheneu. p.81-82, 1993.

RIVALIER, E., SEYDEL, S. Nouveau procede de culture sur lames gélosées appliqué létude microscopique dès champignons deteignes. Ann. Parasitol. 10: 444-452, 1932.

SILVA,R.,R.,COELHO,G.,D. **Fungos Principais Grupos e Aplicações Biotecnológicas**. Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente Curso de Capacitação de monitores e educadores. INSTITUTO DE BOTÂNICA – IBt. São Paulo, outubro de 2006. Disponível em: http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glaciene_Coelho.pdf. Acesso em: maio de 2012.

SOUZA,F.S.;et al. Avaliação de Antagonismo Microbiano Entre Fungos Isolados de Ambiente Poluído e Bactérias Patogênicas. In: SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 6, 2009. Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2009. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0659-1.pdf> Acesso em abril de 2012.

SCHULLER,D.,E. Desenvolvimento de um Meio de Cultura Seletivo/Diferencial Para a Levedura de Contaminação Alimentar Zygosaccharomyces Bailii.1998.133 f.(Mestrado em Ciências do Ambiente)- Universidade do Minho, Departamento de Biologia, Braga,1998. Disponível em: http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3217/1/DSchuller_Diss_Mestr.pdf, Acesso em: março de 2012.

TÁVORA, L.G.F.; et al. Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. v.36, n..5, 2003.

TRABULSI,L.R.;ALTERTHUM,F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo:Atheneu,2005.

USP – United States Pharmacopeia XXXII. National Formulary 27. Chapter <1116>: **Microbiological Evaluation of Clean Rooms and Other Controlled Environments**. USA: 2009.

UTESCHER, C.L.A.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R.; GAMBALE, V. Microbiological Monitoring of Clean Rooms in Development of Vaccines. **Brazilian J. Microbiol.** v. 38, p. 710-716, 2007.

XAVIER, O.M., MADRID, M.I., CLEFF, B.M., CABANA, L.A., FILHO, S.P.R., MEIRELES, A. C.M., **Contaminação do Ar por *Aspergillus* em Ambiente de Reabilitação de Animais Marinhos**, Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 45, n. 3, p. 174-179, 2008.