



CNEN/SP

ipen *Instituto de Pesquisas
Energeticas e Nucleares*

TÉCNICAS BÁSICAS DE LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO DE
MATERIAIS PARA CULTURA DE CELULAS

Takeko Shimizu KIYAN

PUBLICAÇÃO IPEN 327

DEZEMBRO/1990

SÃO PAULO

**TÉCNICAS BÁSICAS DE LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO DE
MATERIAIS PARA CULTURA DE CÉLULAS**

Takeko Shimizu KIYAN

DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C11 00

TISSUE CULTURES
STERILIZATION
CLEANING

IPEN Doc 3645

Aprovado para publicação em 13/11/90

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são da responsabilidade do(s) autor(es)

TÉCNICAS BÁSICAS DE LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO
DE MATERIAIS PARA CULTURA DE CÉLULAS

Takeko Shimizu KIYAN

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR-SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

RESUMO

A cultura de células necessita ser realizada em condições estritamente assépticas pois as culturas animais "in vitro" crescem mais lentamente do que os contaminados naturais como as bactérias, fungos e leveduras. O objetivo deste trabalho é proporcionar uma fonte de consulta segura em técnicas de lavagem, preparo e esterilização de materiais usados em laboratório de cultura de células, etapas estas consideradas as mais importantes.

BASICS TECHNIQUES FOR
WASHING OUT AND STERILIZATION
OF MATERIALS FOR TISSUE CULTURES

Takeko Shimizu KIYAN

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR-SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

ABSTRACT

The major requirement distinguishing tissue culture from other laboratory techniques is the need to maintain asepsis. This is accentuated by the much slower growth of cultured animal cells relative to most of the major potential contaminants like, bacteria, fungi and yeasts. This manual is intended to allow the security measures in washing out preparation and sterilization of materials once considered as the most important phases used in tissue culture laboratories.

LAVAGEM DE VIDRARIA

Em laboratório de cultura de células é a etapa mais importante e a que exige maiores cuidados

A vidraria após sua utilização deve ser imediatamente imersa em água para evitar que a matéria orgânica ao secar, fique aderida às paredes e dificulte a lavagem posteriormente

Se a vidraria for tratada com silicone, não deverá ser misturada às demais. Antes da lavagem, retirar todo o silicone com solventes orgânicos (éter ou acetona)

Recomenda-se o uso de detergente neutro, de preferência, o Extran MA-02. A solução deverá ser feita de preferência, com água destilada. Em materiais pouco sujos, utilizar uma solução a 2%. Nos casos de materiais mais sujos, utilizar 5%. Soluções mais concentradas (10%) podem ser utilizadas com a função de descontaminação, contudo devem ser utilizadas durante 4 horas e na temperatura de 90°C.

O Extran MA-02 é biologicamente degradável, tem propriedades detergentes e emulsionantes.

Uso na Rotina

Utilizar detergente neutro (Extran-MA-02) em solução a 2%, obedecendo a seguinte técnica:

1. Lavar a vidraria em água corrente, escovar muito bem, utilizando uma escova apropriada,
2. Passar no esguicho-lavador (quanto existir no laboratório). Na falta do esguicho-lavador, adaptar um tubo de borracha à torneira e pressionar a ponta do tubo com os dedos para fazer com que a água saia com pressão,
3. Deixar de molho na solução de Extran MA-02 a 2%, tendo o cuidado de manter os frascos cheios e cobertos pela solução durante 1 noite no mínimo,

A solução deve ser reutilizada. Quando em um determinado período a quantidade de material a ser lavado for muito grande, a solução deverá ser trocada a cada 15 dias.

Nota Antes de mergulhar os materiais na solução de Extran, retirar com álcool ou éter as inscrições feitas com pincel atômico. Desse modo a solução permanecerá limpa por mais tempo.

- 4 Escovar rigorosamente e passar em água corrente,
- 5 Enxaguar muito bem utilizando o esguicho-lavador,
- 6 Enxaguar com bastante agitação, 10 vezes no mínimo (10 x) em água destilada. Prestar muita atenção quanto ao preenchimento e esvaziamento total do frasco em cada operação,
- 7 Repetir o item 6, utilizando água bidestilada. É preferível deixar em repouso nesta água por várias horas,
- 8 Repetir o item 6 utilizando a água desmineralizada,
- 9 Secar a vidraria em forno de secagem ou estufa (40 a 50°C),
- 10 Depois de seco, embalar para a esterilização posterior.

Pipetas

- 1 Mergulhar em água após o uso,
- 2 Retirar o algodão colocado na ponta,
- 3 Lavar em água corrente,
- 4 Deixar em repouso uma noite em solução de Extran ou fervê-las durante 15 minutos em solução de detergente.
- 5 Colocar em lavador de pipetas por 5-6 horas,
- 6 Passar 10 vezes em água destilada,
- 7 Passar 10 vezes em água bidestilada,
- 8 Passar 10 vezes em água desmineralizada,
- 9 Secar em forno ou estufa (40-50°C).

Nota Os materiais contaminados, devem ser autoclavados, imersos em água, durante 20 minutos a 121°C. Depois disso, seguir a sequência de lavagem de material.

Nota Não lave as pipetas que foram usadas em agar ou silicone com outras pipetas sujas. Estas devem ser lavadas separadamente em água corrente bem quente ou se puder use pipetas descartáveis.

LAVAGEM DE ROLHAS DE BORRACHA

As rolhas de borracha anti-ácidas, novas, especiais para cultura celular, são fervidas

- 1 Por 15 minutos em solução de hidróxido de sódio a 0,5% e lavadas por 30 minutos em água corrente
- 2 Por 15 minutos em solução de ácido clorídrico a 0,4% e lavadas em água corrente durante 1 hora
- 3 Passam-se a seguir em água destilada, bidestilada e desmineralizada antes da secagem

As rolhas usadas que tenham ficado imersos na água após o uso são fervidas em água destilada, seguindo-se depois o mesmo procedimento do item 3

Quando tiverem material orgânico aderido, deve-se fervê-las em solução de bicarbonato de sódio a 4% e em seguida lavadas em água corrente por 60 minutos e por fim seguir o item 3

Seca-se em estufa ou ao ar livre (nunca num forno)

LAVAGEM DE AGULHAS E SERINGAS HIPODÉRMICAS

- 1 Deixar as seringas comuns mergulhadas em água, fazendo-as funcionarem 10 a 15 vezes com água de torneira
- 2 Colocar as seringas desmontadas, assim como as agulhas no aparelho de ultra-som imersos em água destilada ligar o aparelho por 10 minutos
- 3 Montar as seringas e fazê-las funcionar de 10 a 15 vezes, em água destilada, posteriormente em bidestilada e desmineralizada
- 4 Secar desmontadas em estufas

SERINGAS AUTOMÁTICAS

- 1 Logo após o uso, acionar a seringa automática por 15 a 20 vezes com água destilada para eliminar os resíduos de solução de trabalho
- 2 Desmontar a seringa, colocá-la com cuidado no aparelho de ultra-som com água destilada, durante 10 minutos
- 3 Montar a seringa e fazê-la funcionar 10 a 15 vezes com água destilada, depois com água bidestilada e água desmineralizada
- 4 Por último, fazê-la funcionar por 10 a 15 vezes em água desmineralizada glicerinada a 10% para dar uma certa lubrificação
- 5 Secar na estufa e preparar para a esterilização
- 6 Outra alternativa é após a lavagem, esterilizar a seringa automática cheia de água deionizada em vez de passá-la em água glicerinada

PREPARO DA VIDRARIA PARA A ESTERILIZAÇÃO

Seringas hipodérmicas e agulhas são montadas dentro de tubo de ensaio, em cujo fundo deve ser colocado um pedaço de gaze hidrófila, em seguida, arrolhados com tampão de algodão hidrófobo recoberto com gaze e fechados com papel alumínio ou papel manteiga e por último com papel kraft, amarrando com barbante ou cordonê

As pipetas devem ser providas de algodão em rama (hidrófobo) na extremidade destinada à aspiração embrulhados em grupos com papel kraft quando forem esterilizados em autoclave ou quando houver possibilidade, acondicioná-las em tubo de aço inoxidável e esterilizá-las em forno Pasteur a 180°C

Os tubos de ensaio devem ser acondicionados de boca virada para baixo, e acondicionados em recipiente de alumínio ou aço inoxidável com tampa

Os frascos de vidro devem ter a sua boca guarnecida com papel alumínio ou papel manteiga, embrulhando-os em papel kraft e amarrados com cordonê ou barbante

Frascos, tubos, pipetas, etc, quando forem de material plástico, somente poderão ser esterilizados em autoclave quando forem do tipo polipropileno

Os instrumentos de corte são esterilizados em autoclave devidamente acondicionados em guardanapos de algodão que são por sua vez embrulhados em papel kraft

Os artigos de borracha são esterilizados em autoclave sem exceder os limites de tempo e temperatura pois alguns tipos de borracha podem ficar "pegajosos"

As seringas automáticas tipo Cornwall, por serem importadas, devem ser esterilizadas com muito cuidado, envolvidas em guardanapos, colocadas sobre uma tábua de madeira fina e por fim embrulhadas com papel kraft. Este procedimento serve para protegê-las de choques durante o processamento da esterilização até o momento do uso

ESTERILIZAÇÃO

Esterilizar um material é destruir todos os microorganismos, formas vegetativas ou esporuladas, nele existente. Ao ato de esterilizar dá-se o nome de esterilização

A desinfecção é um caso particular da esterilização, que se refere especificamente à eliminação dos germes patogênicos, sem que haja necessariamente a destruição de todos os microorganismos, pois os patogênicos geralmente são menos resistentes que os saprófitas, poderá haver eliminação dos primeiros com persistência dos últimos

A esterilização só pode ser efetuada de modo seguro pelo emprego de agentes físicos (calor), a desinfecção se consegue facilmente pelo uso de substâncias químicas, as quais se dá o nome de desinfetantes

A esterilização pode ser realizada por meio de

- 1 Calor,
- 2 Radiações,
- 3 Filtração

1 Calor

É o agente esterilizante físico mais eficaz. Pode ser empregado sob várias formas.

1 a Seco

Flambagem em chama direta Bico de bunsen

Incineração

Ar quente Forno Pasteur

1 b Úmido

Temperatura baixa (50-70°C) - Pasteurização

Temperatura de 100°C água fervente (ebulização), vapor flúente

Temperatura superior a 100°C vapor d'água sob pressão (autoclave)

2 Radiações

2 a Ultravioleta

2 b Ionizante radiação gama

3 Filtração

A esterilização por meio de filtrações de fases líquidas, podem ser realizadas com os mais variados materiais, como argila, areia, carvão, filtro de papel, etc.

I ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR

I a Calor Seco

Bico de Bunsen - A destruição de microorganismos pelo calor direto é praticada rotineiramente quando a alça de platina é levada à chama de um bico de bunsen.

Incineração - É usada para eliminar as carcaças de animais de laboratório infectados ou de outros materiais contaminados.

Forno Pasteur - O calor seco atua sobre o microorganismo por meio do processo de oxidação da célula, por isso é mais difícil destruir as formas vegetativas resistentes e esporos microbianos. A temperatura de atuação deve ser de 180°C por um tempo superior a 1 hora e 30 minutos, para que o material seja considerado estéril, pois o calor seco tem menos poder de penetração.

O forno Pasteur consta de um recipiente retangular de paredes duplas isoladas termicamente, aquecido a gás, a vapor ou à eletricidade.

No interior do forno há prateleiras móveis e na parte superior, orifícios ou chaminé para ventilação, além de um orifício onde se coloca um termômetro graduado a 200°C.

Deve-se considerar como início da esterilização quando a temperatura do forno atingir 180°C e o tempo de permanência deve ser acima de 90 minutos. Para se ter certeza de que uma estufa Pasteur atingiu realmente a temperatura de 180°C, colocam-se ampolas de vidro seladas contendo ácido d-tartárico p.a. em pó (aproximadamente 0,30 g). Ao término da esterilização o conteúdo deverá apresentar-se fundido pois a temperatura de fusão do ácido é cerca de 170°C.

A esterilização dos meios de cultura em forno deve ser a 200°C por 3 horas. A temperatura deverá ser controlada a cada 15 minutos. O inconveniente do uso desse processo é que, nesta temperatura, haverá a desnaturação dos componentes do meio, no caso do soro e dos componentes termo-lábeis, no caso das vacinas e antibióticos.

As vidrarias de laboratório são de preferência esterilizadas em forno Pasteur, porque com esse processo consegue-se que todo o material saia seco.

I b Calor Úmido

Pasteurização - É um método de desinfecção do que propriamente de esterilização. O processo consiste em aquecer o material à temperatura relativamente baixa durante um tempo relativamente longo.

Água fervente - A esterilização pela água fervente apresenta alguns inconvenientes:

- a) a temperatura de ebulição varia conforme a pressão atmosférica
- b) a resistência do microorganismo varia, pois depende da sua própria constituição (presença de esporos) e das variáveis como o pH do meio, porcentagem de proteínas, presença de substâncias oleosas etc.

Apesar de todos os cuidados, não é aconselhável o emprego deste método em esterilização pois muitos esporos não são destruídos dentro do período e das especificações referidas.

Vapor fluente - Ocorre os mesmos inconvenientes relatados para a água fervente. O processo é frequentemente utilizado em bacteriologia para esterilização de meios de cultura que se alteram em temperatura elevada, nestes casos utiliza-se a esterilização fracionada ou tyndallização que consiste de aquecimentos repetidos em intervalos adequados.

Vapor de água sob pressão - (autoclavagem ou autoclavação). A autoclave é o aparelho utilizado para esterilizar em vapor d'água saturado sob pressão. É o método mais eficiente na destruição de microorganismos. A eficiência deve-se à ação dos dois requisitos necessários à destruição dos microorganismos: o calor e a umidade. O vapor saturado hidrata e promove a termocoagulação das proteínas dos microorganismos.

Importância da eliminação do ar residual da autoclave - Todo o ar existente na autoclave deve ser eliminado porque

retarda ou impede a esterilização

A ação esterilizante do vapor é devida à facilidade com que ele se condensa sobre as superfícies mais frias dos objetos a serem esterilizados, cedendo-lhes o seu calor latente. O ar interfere com esta condensação, formando um filme protetor em torno do material e evitando, assim, a penetração do calor.

A checagem da temperatura atingida na câmara interna da autoclave pode ser realizada pela inclusão de ampolas de vidro seladas, contendo cerca de 0,20 g de enxofre em pó, junto com os materiais que vão ser esterilizados. Após o ciclo de esterilização, o enxofre deverá estar fundido pois a temperatura de fusão do enxofre é 121°C.

Atualmente temos a fita adesiva 1222-3M, que ao atingir a temperatura desejada e o tempo necessário, muda de cor.

Uma prova da esterilização por calor úmido em autoclave consiste na inclusão de ampolas de Sterikon-Bioindicador (Merck) em cada carga do aparelho. Elas contêm meio de cultura com açúcar em sua composição, além de um indicador de pH e de esporos de bacilos termófilos (*Bacillus stearothermophilus*). Estes bacilos após 15 minutos a 121°C são destruídos. Em temperaturas mais baixas e com tempo de aquecimento mais curto estes esporos sobrevivem. Após o tempo de autoclavagem mencionado, as ampolas autoclavadas são colocadas em estufa a 55°C por 24-48 horas juntamente com outra ampola não autoclavada (controle). Se a esterilização foi eficiente, os esporos das ampolas autoclavadas terão sido destruídos e o conteúdo das ampolas manterá a sua cor original. Se a esterilização foi imperfeita, o conteúdo das ampolas mudará da cor violeta para a amarela pois contém germes vivos que se multiplicam durante a incubação.

Deve-se observar sempre o prazo de validade das ampolas bem como as condições de estocagem.

Técnica de utilização em autoclave - A autoclave consiste de um recipiente metálico, que pode ser fechado hermeticamente. Colocar uma quantidade de água no fundo do recipiente onde está instalada a fonte de calor (resistência recoberta). Introduzir os materiais embalados no cesto apropriado da autoclave, sobre o nível da água já medido. Fechar a autoclave, apertando os parafusos de modo a fechar hermeticamente. Ligar o sistema de aquecimento. Deixar a válvula de segurança aberta para expulsar todo o ar do interior. A princípio, há a expulsão do ar contido na caldeira, quando a água começa a ferver, sai um jato intermitente de ar misturado com vapor d'água. Quando todo o ar é expulso do aparelho, começa a sair um jato contínuo de vapor d'água. Fecha-se nesse momento o orifício de escape, o manômetro começa a acusar aumento de pressão. Ao se atingir a temperatura desejada, por exemplo, 120°C, fecha-se a válvula de segurança e deixa-se por 30 minutos. Ao término da esterilização, deve-se desligar o sistema de aquecimento, esperar esfriar e abrir o aparelho quando a pressão do manômetro acusar zero. Esta precaução é essencial não só porque abrir a autoclave com alta pressão faria projetar a tampa ou vapor super aquecido, com risco para o operador, como também porque, provocando abaixamento rápido da pressão, por exemplo, pela brusca abertura da válvula de segurança, os líquidos contidos no interior da autoclave entrariam em fervura, fazendo saltar as rolhas ou molhando-as. Abrir a válvula de segurança para que todo o ar saia e em seguida abrir a autoclave. Levar o material esterilizado para uma estufa de secagem, temperatura de 40-50°C.

É o processo mais empregado para a esterilização e a maioria dos tipos de vidro de boa qualidade suporta bem a essa temperatura, mesmo após repetidas esterilizações.

A esterilização de frascos contendo soluções é feita na autoclave, por aquecimento pelo vapor saturado a 121°C por 30 minutos. Os cuidados que devem ser tomados

- a - Prover os frascos com vedação (papel alumínio e ou kraft) que permite a expulsão do ar
- b - Evitar o abaixamento de pressão na câmara de esterilização, antes do resfriamento completo do líquido

Todos os materiais, antes de serem esterilizados, deverão ser lavados com muito cuidado, conforme recomendado no capítulo de lavagem de material.

II - ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÕES

- 1 - Radiações ionizantes - Os raios X e os raios gama (γ) têm energia maiores do que eV e são chamados de radiações ionizantes. Possuem energia suficiente para retirar elétrons de moléculas, ionizando-as. Quando essas radiações atravessam as células, criam hidrogênio livre, radicais hidroxila e alguns peróxidos, os quais, por sua vez podem causar diferentes tipos de lesões intracelulares. Por esta razão, as radiações ionizantes são utilizados na esterilização de materiais biológicos. É chamada de esterilização fria, porque as radiações ionizantes produzem relativamente pouco calor no material irradiado e assim, é possível esterilizar substâncias termossensíveis, especialmente na indústria alimentícia e farmacêutica.
- 2 - Radiações ultra-violeta (UV) - Possuem comprimento de onda de 253,7 nanômetro (nm) que tem a propriedade de matar os microorganismos. Ex lâmpada UV. Os raios emitidos pelas lâmpadas germicidas atravessam o ar e destroem os microorganismos encontrados no trajeto. Os raios UV devem atingi-los diretamente, pois não atravessam os objetos. A utilização inadequada ou exposição excessiva aos raios UV podem ocasionar irritações na pele e nos olhos.

III - ESTERILIZAÇÃO POR FILTRAÇÃO

Na escolha do processo de filtração influem, a natureza do líquido a ser filtrado, o índice de fluxo e o nível desejado de retenção dos materiais particulados presentes. Nas filtrações esterilizantes, mesmo uma eficiência de 99,99% não é suficiente, pois todos os organismos viáveis presentes no líquido precisam ser removidos.

Há 3 tipos fundamentais de filtro

- 1 de profundidade,
- 2 de tela,
- 3 de membrana

É preciso conhecer bem o fundamento da filtração, pois é o único processo de esterilização para certos líquidos, como os meios de cultura, soros, vacinas, etc. Esses meios não devem ser esterilizados pelo calor por causa da ocorrência de desnaturação das proteínas e da degradação dos componentes termo-lábeis.

Em toda a filtração devemos considerar

- a escolha do filtro,
- b organização do sistema de filtração,
- c tipo de pré-tratamento (clarificação)

- 1 De profundidade - Consiste geralmente de fibras, partículas ou materiais de tipo especial que foram comprimidos a ponto de formarem um emaranhado de canalículos comunicantes. Dependendo da compactação, eles podem ser mais fechados ou mais abertos e os seus canalículos podem apresentar tamanho muito variável.

O filtro de profundidade é constituído de material que retém na sua matriz partículas ou microorganismos, porque os poros são geralmente muito maiores do que as partículas e estes movimentam-se durante a filtração pelos canalículos tortuosos até serem retidas nas reentrâncias.

A retenção das partículas pode ser controlada quando se muda a densidade da estrutura do filtro ao utilizarmos pressão, calor ou impregnação das fibras com compostos resinosos

As placas de amianto, velas de cerâmica, laminados complexos de amianto, vidro e papel são exemplos de filtros com propriedades esterilizantes, onde as partículas e microorganismos ficam retidos na matriz do filtro de profundidade. Esta propriedade constitui uma vantagem quando se manipulam soluções altamente contaminadas

- Limitação do Filtro de Profundidade

a) Os filtros de profundidade não removem todas as partículas de um determinado tamanho presentes no líquido, a sua eficiência é em geral da ordem de 90, 95 ou 99% para a remoção de determinado tamanho, de microorganismo ou partícula

b) Quando uma partícula presente num fluido penetra num filtro de profundidade, ela segue o caminho onde a resistência é menor até ficar aderida nele. Quando a pressão diferencial aumenta em consequência do entupimento do filtro ou do aumento da pressão que está sendo utilizada, as partículas e os microorganismos são levados mais para o interior da matriz. Eventualmente, algumas partículas ou microorganismos podem libertar-se e cair no filtrado. Se isto acontecer com microorganismos viáveis, a esterilidade do filtrado estará perdida

- Antes de Usar um Filtro de Profundidade é Necessário Estabelecer

Se o material de que é constituído não terá efeito químico sobre a solução a ser filtrada. Os materiais que compõem alguns filtros de profundidade podem ser tóxicos para certos sistemas biológicos quando forem removidos do filtro pela solução que está sendo filtrada.

Fragmentos ou fibras que compõem a matriz do filtro podem soltar-se durante a filtração, passando para o filtrado, o que é muito inconveniente quando estas soluções destinam-se a produção de injetáveis para o uso humano ou para os animais,

Filtros de profundidade, esterilizante, removem muito eficientemente partículas de tamanho pequeno da solução que está sendo filtrada. Ex: ao esterilizar uma vacina é preciso remover as bactérias sem no entanto perder o antígeno. Isto pode acontecer se uma matriz reter elevada porcentagem do antígeno

2 Filtros de tela (screen) - São de poros uniformes e regularmente dispostos. Apenas as partículas que possuem tamanho menor do que os dos poros podem passar. A estrutura dos poros é pré-definida e como a retenção fica restrita à superfície, a sua capacidade de retenção de partículas é relativamente menor do que a dos filtros de profundidade. Se os poros apresentarem tamanho menor do que as menores bactérias, eles promoverão a esterilização da solução que está sendo filtrada.

3 Filtros de membrana - Os filtros de membrana são filtros de tela com poros de pequeno tamanho (de 10 μm a 0,25 μm). Estes filtros foram dimensionados para a retenção de bactérias e vírus.

As membranas filtrantes são folhas finas e porosas de ésteres puros de celulose. São extremamente porosas, cerca de 84% de sua área superficial são ocupadas por poros. Os ésteres de celulose usados na fabricação de membranas são biologicamente inertes, não causam reações tissulares em animais ou em humanos, são atóxicos e apirogênicos.

A sua capacidade de retenção é menor do que a de um filtro de profundidade. Assim, quando se tem fluidos altamente

contaminados ou grandes volumes, costuma-se antepor um filtro de profundidade ao filtro de membrana. Os filtros de membrana por serem muito pouco espessos (cerca de 150 μm) retêm muito pouco líquido na sua matriz, o que é importante quando o líquido filtrado é caro ou quando a sua perda deve ser mínima. Os filtros de membrana são estáveis à temperatura de cerca de 200°C quando secos, por isso podem ser autoclavados antes de serem usados em esterilização por filtração.

Os alcóois de peso molecular baixo e alguns solventes atacam os filtros de membrana, portanto para a filtração de produtos biológicos de base alcóolica recomenda-se a membrana de tipo especial de Teflon puro ou de politetrafluoretileno.

A planificação de um sistema de filtração envolve tipo de filtro de membrana, diâmetro do suporte desse filtro, acoplamento com um filtro de profundidade (conforme a solução a ser filtrada, este passo é facultativo) e o tipo de sistema que poderá ser a vácuo ou sob pressão. Se a solução a ser filtrada contiver proteínas é aconselhável usar o sistema de pressão, pois o vácuo forma espuma que pode desnaturar as proteínas.

Todos os sistemas esterilizantes devem terminar com uma membrana de 0,22 μm que é esterilizante. O pré-tratamento pode ser necessário, dependendo da natureza do líquido. Os líquidos, de acordo com a maior ou menor dificuldade em serem filtrados, podem ser classificados em:

- 1 Líquidos facilmente filtráveis incluem todas as soluções aquosas cristalinas, meios de cultura sem soro, álcoois, etc. Podem ser filtradas com membrana de 0,22 μm acopladas a um pré-filtro de fibra de vidro (optativo) somente com a finalidade de prolongar a vida útil da membrana, como no caso de volume muito grande de meios.

- 2 Líquidos que requerem clarificação intensa, incluem soluções com
- a) altas concentrações de sólidos,
 - b) com turvação,
 - c) com conteúdo proteináceo e óleo,
 - d) antibióticos,
 - e) vacinas vitrais,
 - f) meios para culturas de células que contenham menos do que 2% de soro não filtrado

A pré-filtração é o método mais indicado. A centrifugação só é viável no caso em que o volume do líquido é pequeno.

- 3 Líquidos de difícil filtração. Incluem soros, plasmas, tripsina e meios de cultura celular que contenham mais do que 2% de soro não filtrado.
- a) Para volumes menores que 1 litro, faz-se a filtração em série

pré-filtro mais poroso → pré-filtro menos poroso → membrana 0,45 µm intermediário → membrana 0,22 µm esterilizante
 - b) Para volumes maiores

placa de amianto → 0,45 µm → 0,22 µm
(pré-filtro, lavado) intermediário esterilizante

Nota Para um laboratório de cultura de células de pequeno porte é mais vantajoso comprar os meios de cultura já prontos para o uso, pois a instalação de uma infraestrutura de filtração como descrita, fica muito onerosa para uso pouco frequente.

DESINFECÇÃO POR MEIOS QUÍMICOS

Desinfetar é destruir bactérias e outros microorganismos pelo uso de agentes químicos. Estes agentes apenas impedem a multiplicação dos microorganismos, não os eliminando completamente. Os agentes químicos levam diferentes nomes de acordo com a sua ação sobre os parasitas. Podem ser germicidas, bactericidas, fungicidas, virucidas, etc.

Os fatores que interferem na desinfecção química são

- a) Contato - Os desinfetantes devem estar em contato direto com os microorganismos. Qualquer película de graxa ou de óleo, de proteínas, como pus e sangue, não deixará ocorrer o contato direto com os desinfetantes, portanto não haverá a desinfecção.
- b) Poder umectante - O poder desinfetante dos líquidos depende da tensão superficial, quanto menor a tensão superficial de um líquido, maior será o seu poder umectante. Os compostos que têm a propriedade de reduzir a tensão superficial da água são sabões, detergentes, glicerinas, etc.
- c) Concentração - Na desinfecção de contato é importante a concentração dos desinfetantes empregados.
- d) Tempo - Os desinfetantes não agem instantaneamente, o processo é realizado gradualmente.
- e) Temperatura - Quanto mais elevada a temperatura, a ação germicida do agente químico é mais intensa, porque o calor acelera as reações químicas.
- f) pH - A concentração hidrogeniônica das soluções afeta a ação desinfetante. Dependendo da natureza química do desinfetante, o efeito do pH é variável.
- g) Matéria Orgânica - A presença de colóides ou proteínas (pus e sangue) no material impede o contato direto dos microorganismos com os desinfetantes diminuindo a sua eficácia.

ASSEPSIA DE CÂMARAS DE CULTURA CELULAR

As câmaras assépticas devem estar localizadas em pontos de pouco movimento e livres da poeira do ar. A limpeza das câmaras devem ser feitas no fim do dia (se o uso for contínuo) ou no fim de cada experimento. O chão deve ser limpo primeiramente de maneira normal, sendo depois passado os desinfetantes. As mesas e as paredes devem também ser limpas de maneira normal e depois passados os desinfetantes. Os desinfetantes mais usados são lisoform bruto, Duo-Cide, etc. Tomar cuidado para não misturar os panos de limpeza que são utilizados para o chão com os das mesas.

As câmaras assépticas (se forem usadas com muita frequência) devem ser tratadas na sexta-feira à tarde com vapores de formol colocados em placas de Petri ou com os vapores resultantes da reação entre o formol e o permanganato de potássio colocados em placas de material refratário. Não entrar nas câmaras logo após a operação. Esperar até 2ª feira para reiniciar o trabalho.

As lâmpadas germicidas (UV) podem ficar ligadas durante a noite ou entre um trabalho e outro, no interior das câmaras assépticas. Desligar quando reiniciar o trabalho.

Sempre que puder use máscaras e protetores de sapatos, porém, deve abolir qualquer conversa dentro da câmara, falando somente o estritamente necessário. A máscara protege pouco o campo de trabalho ao contrário do que a maioria das pessoas supõem.

Os aventais em câmaras estéreis devem ser limpos e de preferência estéreis. Não misturar os aventais com os usados em outras atividades. Se puder, deixe-os na anti-câmara após o trabalho.

As câmaras assépticas devem ser testadas regularmente, (no mínimo de 15 - 15 dias, conforme a demanda do serviço) quanto ao seu grau de contaminação. No dia seguinte à limpeza, desligar as lâmpadas UV, que ficam normalmente ligada durante a noite, colocar 6 placas de Petri abertas contendo os seguintes meios: 2 de agar-tioglicolato Brewer, 2 de agar-caldão de soja e 2 de agar-Sabouraud, sendo 3 de cada, em cima da mesa e o restante no chão, deixando-as abertas por 10 minutos. No final deste tempo, fechá-las e incubá-

las a 349C durante 4 dias em posição invertida Não esquecer de in cubar junto as 3 placas controle (1 placa de cada meio) que não fo ram abertas Examinar as placas diariamente, até o 49 dia, quando será feita a contagem das colônias

Todo o trabalho na câmara asséptica deve ser realizado ao redor do bico de Bunsen A chama do bico de Bunsen promove a des - truição de microorganismos pelo calor direto

O bico de Bunsen deve ter um dispositivo regulador da altu - ra da chama, porque quando muito alta, além de não ter a eficiên - cia aumentada só colabora para o aquecimento do ambiente

CAPELA DE FLUXO LAMINAR

A capela de fluxo laminar consta de um gabinete principal dentro do qual circula uma cortina de ar forçado, originada por um ventilador Antes de ser introduzido no gabinete, o ar passa atra - vés de um filtro HEPA que o purifica, retendo partículas de até 0,3 μ m com grande eficiência Neste ambiente de ar estéril é pos - sível trabalhar em condições ótimas de esterilidade, prescindin - do da flambagem e podendo manter os frascos abertos, sem a tampa, durante as manobras A capela pode ser de fluxo horizontal ou ver - tical

O filtro HEPA não perde a capacidade com o uso, ao contrá - rio, ela aumenta por causa das partículas ficarem retidas entre as fibras, fechando ainda mais a manta filtrante Assim, os filtros devem ser trocados de tempos em tempos em consequência da restri - ção de passagem de ar (HEPA-High Efficiency Particulate Air)

As capelas de fluxo laminar devem ser limpas com uma solu - ção de cloreto de benzalcônio a 5% em álcool 70 GL, assim como to - dos os objetos e vidrarias introduzidos nelas Para superfície de acrílico, como a solução alcóolica as deixam opacas, é preferível usar uma solução a 0,5% de cloreto de benzalcônio em água

Após a assepsia, a capela deve ficar ligada por 20 minutos no mínimo, já com o material que se vai utilizar colocado dentro dela, antes de se iniciar o trabalho propriamente dito Os testes

de esterilidade demonstraram que são necessários no mínimo 10 minutos de funcionamento para que a área interna da capela se apresente realmente estéril

Para verificar a esterilidade da capela, deve-se submeter aos testes biológicos mais comuns, como segue

- 1 Após a limpeza normal, deixar a capela funcionando por 5 minutos,
- 2 Colocar dentro da capela, fechadas e em várias posições (lado direito, lado esquerdo e centro), seis placas de cada tipo de meio de cultura (total 18 placas),
- 3 5 minutos depois, abrir 3 placas de cada meio e deixar durante 10 minutos, decorrido este tempo, fechá-las,
- 4 Em seguida, abrir as placas restantes e deixá-las expostas durante 30 minutos, fechando-as após,
- 5 Incubar todas as placas, inclusive as de controle (placas que não foram abertas), a 34°C durante 4 dias, na posição invertida, para evitar a condensação de líquidos,
- 6 No final da incubação contar o número de colônias

CUIDADOS PESSOAIS AO USAR O FLUXO LAMINAR

- a) Todo o material deverá ser limpo antes de ser levado à área interna da capela. Os operadores devem lavar bem as mãos antes de iniciar o trabalho,
- b) Não comer ou fumar próximo da capela. Evitar a circulação desnecessária de pessoas,
- c) O pessoal deverá usar aventais ou roupas que não desprendam fibras,
- d) Laminar a entrada de papel e de barbante dentro da capela. Não usar lápis ou borracha, pois, desprendem partículas indesejáveis,
- e) Evitar o uso de solventes que ressequem a pele e promovam a descamação. Para evitar isto, poderão ser usados loções, cremes ou sabonetes contendo lanolina,
- f) As unhas deverão ser curtas, evitando-se o uso de esmaltes,
- g) É recomendada o uso de luvas, se necessário

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BIER, O Microbiologia e imunologia 24 ed São Paulo, Editora Melhoramentos, 1985
- 2 - COLDWICK, S P and KAPLAN, N O Cell culture In JAKOBY, W B & PASTAN, I H , eds Methods in enzymology New York, N Y , Academic Press, 1979 V 58
- 3 - FRESHNEY, R I Culture of animal cells A manual of basic technique New York, N Y , Alan R Liss, 1984
- 4 - PAUL, J Cell and tissue culture 4 ed London, E and S Livingstone, 1970
- 5 - PELCZAR, M , REID, R CHAN, E C S Microbiologia, vol 1 São Paulo, Mc Crow - Hill do Brasil, 1980
- 6 - RIZZO, E , TUCHIYA, H N , MARTINEZ, C H Técnicas Básicas de Cultura Celular São Paulo, 1983 (Apostila - Instituto Butantã e Instituto Adolpho Lutz)