



NORMA TÉCNICA

L5.501

Dez/1987
29 PÁGINAS

Preparo de culturas celulares para ensaios virológicos:
procedimento

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	PREPARO DE CULTURAS CELULARES PARA ENSAIOS VIROLÓGICOS Procedimento	L5.501 DEZ/87
--------	---	----------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	1
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	4
5 Execução do ensaio.....	17

INTRODUÇÃO

Diversos tipos de células animais tais como as de embriões e adultos têm sido cultivadas "in vitro" por períodos variáveis de tempo, possibilitando o seu estudo sob várias condições.

As culturas celulares passaram a ter papel importante no diagnóstico das viroses a partir de 1948 quando Weller & Robbins demonstraram que o poliovirus tipo 2 podia replicar-se em cultura de tecidos de origem nervosa de embriões humanos, determinando um efeito citopatogênico facilmente observável nas culturas infectadas.

A partir desta época, grandes variedades de células humanas e animais, neoplásicas ou não vem sendo largamente utilizadas em diagnóstico virológico. Os sistemas celulares são amplamente empregados pois requerem pouco espaço físico, proporcionam o isolamento de vírus, preparo de antígenos virais, testes específicos tais como os de neutralização, hemadsorção, anticorpos fluorescentes e cultivo conjunto. Além disso, são convenientes para a produção de vacinas por fornecerem preparações com elevadas concentrações virais relativamente isentas de materiais estranhos.

Algumas linhagens celulares não apresentam a mesma sensibilidade das culturas primárias ao crescimento de certos vírus, mas prestam-se ao isolamento de enterovírus, adenovírus e vírus respiratório sincicial. Outros vírus que não podem ser isolados diretamente, podem ser adaptados ao crescimento nessas linhagens para serem submetidos posteriormente a testes que identifiquem esses vírus.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os procedimentos que permitem multiplicar populações celulares em forma de monocamadas, para fins de diagnóstico virológico.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Para aplicação desta Norma pode ser necessário consultar:

- M1.002 - Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular
- L5.215 - Prova de adequabilidade biológica de água destilada para fins microbiológicos
- L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura
- L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.18.

3.1 Agentes quelantes

São agentes que ligam-se aos cátions divalentes que estabilizam a matriz intercelular, tais como o citrato de sódio e o versene também conhecido como EDTA. Estes agentes não são utilizados para dispersar células de tecidos frescos e nem para células fibroblásticas pois são mais eficazes para células epiteliais.

3.2 Cariótipo

É o conjunto de informações genéticas sobre a forma, número, tamanho e características especiais dos cromossomos de uma célula.

3.3 Células diplóides

Células que apresentam dois cromossomos de cada tipo, chamados cromossomos homólogos.

3.4 Cepa celular

É a população celular derivada de tecido de origem animal, cultivada mais de uma vez "in vitro", que ainda mantém o cariótipo do tecido de origem e que não pode ser repicada indefinidamente.

3.5 Conjunto de células heteroplóides

São aquelas que apresentam em conjunto, menos de 75% de suas células com constituição cromossômica diplóide.

3.6 Cultura celular

É a cultura "in vitro" das células dispersas de um tecido animal e/ou humano.

3.7 Cultura primária

É a cultura iniciada de células, tecidos ou órgãos tomados diretamente de um organismo. É considerada como tal, até o 1º cultivo.

3.8 Linhagem celular

É o conjunto de células que se multiplicam "in vitro" por longos períodos de tempo. A heteroploidia é a responsável pela passagem "in vitro" das células primárias que são diplóides à condição de linhagem celular.

3.9 Meio de crescimento

É o meio de cultura Eagle que contém 10% de soro fetal bovino inativado com ou sem solução de antibióticos. É usado para promover a rápida proliferação celular.

3.10 Meio de cultura

É a mistura balanceada de substâncias consideradas essenciais para as células: aminoácidos, vitaminas, carboidratos, sais e proteínas que apresentam pH 7,0-7,2 e, assim fornece às células que se multiplicam "in vitro" ambiente semelhante àquele que dispõem "in vivo".

3.11 Meio de manutenção

É o meio de cultura Eagle que contém 2% de soro fetal bovino inativado com ou sem solução de antibióticos. É usado para manter a cultura em estado de metabolismo baixo e contínuo, não necessariamente em multiplicação.

3.12 Monocamada celular

É a camada única de células crescendo sobre uma superfície sólida (vidro ou plástico).

3.13 p.a.

Para análise.

3.14 q.s.p.

Quantidade suficiente para.

3.15 Repique

É o processo pelo qual se mantém a linhagem das células, aumentando o seu número e, a divisão de uma cultura ocorre quando a camada celular estiver confluenta.

3.16 Semente

É a população celular a partir da qual se obtém, por repique, populações maiores. Esta semente pode ser mantida congelada em atmosfera de N₂ líquido ou em multiplicação ativa.

3.17 Soro fetal bovino inativado

O soro fetal bovino inativado, no meio de cultura é um componente suplementar - estimulador cujas funções principais são nutrir e tam

bém inibir certas enzimas proteolíticas secretadas pelas próprias células. O fator essencial presente no soro é a fetuína de origem proteica, que parece ser necessária ao achatamento das células sobre a superfície do vidro. A inativação do soro é efetuada através do aquecimento em banho-maria a 56°C, por 30 minutos, na qual são inativados inibidores ou aglutininas não específicas, contidas no soro.

3.18 Tripsinização

É o processo de obtenção de células finamente dispersas a partir de fragmentos de órgãos ou tecidos pelo uso da tripsina.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado por esse método e ser equipada com válvula de segurança, com um manômetro e com um termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave é normalmente operada a uma pressão de vapor de 15 libras por polegada quadrada (1,02 kg/cm²), produzindo, em seu interior uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

4.1.2 Balanças

- a) com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.
- b) com sensibilidade mínima de 1 mg ao pesar 10 g.

4.1.3 Bomba de vácuo e pressão

Ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão de 1 kgf/cm².

4.1.4 Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical)

Equipamento que possibilita a retenção de partículas do ar através da passagem do mesmo por filtros HEPA, cuja eficiência é de 99,99% para partículas iguais ou maiores a 0,3 µm. O ar estéril produzido é dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho, proporcionando grande segurança nos manuseios que devem ser realizados

em condições de máxima esterilidade como também proteção dos operadores.

4.1.5 Centrífuga refrigerada

Com velocidade até 6 000 rpm e que tenham rotores com caçapas para volumes de até 20 mL e 1 000 mL.

4.1.6 Congeladores

Com regulagem para manter a temperatura na faixa de -20°C . É destinado ao armazenamento de soluções. A limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.7 Destilador de água ou sistema purificador de água

Devem produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação celular.

4.1.8 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, tubos de ensaio, frascos de meios de cultura e toda vidraria que pode ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180°C . O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 4 a 6 horas à temperatura de 170 a 180°C .

4.1.9 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com capacidade suficiente para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deve manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada em local onde a temperatura permaneça preferencialmente na faixa de 16 a 27°C .

4.1.10 Máquina dosadora automática de Brewer

Com capacidade para dosar 5 a 50 mL de meio de cultura ou de suspensão celular.

4.1.11 Microscópios binoculares de focalização invertida

4.1.12 Porta filtros

De aço inoxidável, diâmetros de 47 mm, 142 mm e 293 mm.

4.1.13 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão mínima de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH 4,00, pH 6,86 e pH 9,18.

4.1.14 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C, com capacidade para conter os meios de cultura e as soluções a serem mantidas sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.15 Vasilhames de pressão

Com capacidade de 5,10 e 20 litros.

4.2 Materiais

4.2.1 Algodão hidrófilo

4.2.2 Ampolas de vidro Pyrex ou similar

Temperadas para congelamento a -196°C.

4.2.3 Bandejas de aço inoxidável

4.2.4 Barra magnética

Recoberta por teflon, tamanho 6 cm x 1 cm.

4.2.5 Braçadeiras

Tipo rosca sem fim de 1" e 1/2".

4.2.6 Bico de Bunsen

4.2.7 Câmara de Neubauer

Para contagem de células.

4.2.8 Chaves especiais

Para os porta filtros

4.2.9 Estantes de aço inoxidável

Perfuradas, para tubos de cultura celular com cunhas para ajuste do ângulo de inclinação.

4.2.10 Etiquetas

4.2.11 Flaconete

Do mesmo tipo utilizado para acondicionar solução de penicilina, com capacidade de 20,0 mL e com tampa de borracha.

4.2.12 Fita crepe

4.2.13 Fita crepe especial

Para controle do material submetido à esterilização, estufa ou autoclave.

4.2.14 Fita de teflon

Para vedar juntas.

4.2.15 Frascos

Com capacidade de 1 000 mL, com tampa de rosca, para armazenamento do meio de cultura.

4.2.16 Frascos com face plana de 44 cm² para cultivo de células (semente)4.2.17 Frascos Cultex ou similar com uma face plana de 25 cm² para cultivo de células4.2.18 Garrafas de Roux com uma face plana de 209 cm² para cultivo de células4.2.19 Gaze estéril4.2.20 Kitasatos de vidro neutro com capacidade de 125, 1 000 e 2 000,0 mL4.2.21 Mangueiras de borracha

Com parede espessa, resistentes à pressão.

4.2.22 Mangueiras de plástico rígido, de 1/4"4.2.23 Materiais para preparação de meios de cultura e reagentes

Recipientes de vidro neutro ou aço inoxidável. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.2.24 Membranas filtrantes

De éster de celulose, com porosidade de 0,22 µm e 0,45 µm, com diâmetros de 142 mm e 293 mm.

4.2.25 Papel de alumínio4.2.26 Papel filtro4.2.27 Papel Kraft4.2.28 Peras de sucção ou pipetadores de segurança4.2.29 Pinças dente de rato4.2.30 Pinças de pontas retas e bordas lisas4.2.31 Pincel demarcador

Para escrita em vidro.

4.2.32 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 1,0 mL, 5,0 mL e 10,0 mL com graduação de 1/10 e

erro de calibração inferior a 2,5% e com bocal para tampão de algodão. São guardadas em porta-pipetas, de aço inoxidável, podendo também ser embrulhadas individualmente em papel Kraft. São esterilizadas por calor seco a 170-180°C, durante 4-6 horas.

4.2.33 Pisseta

Para álcool etílico a 70%.

4.2.34 Placa agitadora magnética

Com velocidade regulável.

4.2.35 Porta-pipetas de aço inoxidável

4.2.36 Pré-filtro de fibra de vidro

Tipo AP-20, com diâmetros de 142 mm e 293 mm.

4.2.37 Protocolos

- a) para registro das repicagens de culturas celulares;
- b) para registro das congelações de culturas celulares.

4.2.38 Provetas graduadas

Com marcação externa, nos volumes de 100,0, 250,0, 500,0, 1 000,0 e 2 000,0 mL.

4.2.39 Rolhas de borracha ácido-resistente, nº 1 a 9

4.2.40 Selador de ampolas de vidro Pyrex ou similar

4.2.41 Seringas automáticas tipo Cornwall de 2 e 5 mL

4.2.42 Seringas hipodérmicas com agulhas

4.2.43 Tambor de nitrogênio líquido

Com capacidade para conservação de 50 litros de nitrogênio líquido à temperatura de -196°C e equipado com 6 recipientes para comportar as ampolas de diferentes linhagens celulares durante a congelação.

4.2.44 Tubos de ensaio

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, de 15 mm x 150 mm.

4.3 Reagentes

Para o preparo dos meios de cultura, devem ser utilizados reagentes da melhor qualidade, isto é, devem ser de grau bacteriológico e de procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas. Uma vez feita a escolha dos reagentes, seu uso deverá ser padronizado e, quando possível, serem mantidos sem modificações posteriores. Datar os frascos de reagentes após recebimento e abrir ficha controle na qual devem constar a data de chegada e todas as pesagens realizadas. Isto permite o controle do estoque de drogas existentes no laboratório.

4.3.1 Reagentes necessários

- Ácido clorídrico (HCl)
- Ácido cítrico
- Ácido fólico (cristalino)
- Água bidestilada
- Água destilada
- Álcool etílico comercial
- l-arginina . HCl
- Bacto-triptose, p.a.
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), p.a.
- Biotina
- l-cistina
- Cloreto de cálcio (CaCl_2 anidro)
- Cloreto de colina
- Cloreto de potássio
- Cloreto de sódio (NaCl), p.a.
- Dextrose, p.a.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), p.a.
- l-fenilalanina
- Formalina
- Fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4), p.a.
- Fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), p.a.
- Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
p.a.
- D-galactose, p.a.
- Glicerol, p.a.
- l-glutamina
- Hidróxido de sódio (NaOH) em lentilhas, p.a.
- l-histidina . HCl
- i-inositol
- l-isoleucina
- l-leucina
- l -lisina
- l-metionina
- Nicotinamida
- Pantotenato de cálcio
- Penicilina G-potássica
- Piridoxina. HCl
- Riboflavina
- Sulfato de gentamicina

- Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Tiamina . HCl
- l-tirosina
- l-treonina
- l-triptofano
- Tripsina 1:250, p.a.
- Tripticase Soy Broth (TSB)
- Titriplex III ou EDTA (ácido etilenodiamino-tetracético)
- Versene, p.a.
- l-valina
- Vermelho de fenol
- Violeta de genciana, cristal.

4.4 Soluções

4.4.1 Solução balanceada de Hanks - 10 x concentrada (1 L 10 x concentrada = 10 litros diluídos).

Nota: Esta solução é composta pelas soluções 1 e 2.

4.4.1.1 Solução 1

Fórmula:

Cloreto de sódio (NaCl).....	80,0 g
Cloreto de potássio (KCl).....	4,0 g
Cloreto de cálcio (CaCl_2).....	1,4 g
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	2,0 g
Água bidestilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e dissolver cada uma das substâncias separadamente em pequenos volumes de água e após dissolução, completar o volume total até 500 mL com água bidestilada.

4.4.1.2 Solução 2

Fórmula:

Fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....	1,2 g
Fosfato de potássio (KH_2PO_4).....	0,6 g
Dextrose (ou glicose).....	10,0 g
Vermelho de fenol a 1%.....	16 mL
Água bidestilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e dissolver cada uma das substâncias separadamente em pequenos volumes de água (menos de 500 mL). Juntar o vermelho de fenol. Completar o volume total até 500 mL com água bidestilada.

4.4.1.3 Preparo final da solução balanceada de Hanks - 10 x concentrada

Adicionar a solução 2 à solução 1, sob agitação. Diluir 1:10 com água bidestilada. Esterilizar por filtração (item 4.6.1). Distribuir a solução filtrada em volumes de 500,0 mL efetuando prova de esterilidade, colocando todos os frascos à temperatura de 35°C durante 24-48 horas. Armazenar em congelador a -20°C.

4.4.2 Solução de penicilina G-potássica cristalina

Fórmula:

Penicilina G-potássica cristalina.....	10 milhões U
Solução balanceada de Hanks 1 x concentrada.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver o conteúdo de um frasco com 100 mL de solução balanceada de Hanks 1 x concentrada. Distribuir a solução em volumes de 50 mL. Armazenar em congelador a -20°C. Utilizar 0,1 mL para cada 100 mL de meio de cultura.

4.4.3 Solução de sulfato de gentamicina

Fórmula:

Sulfato de gentamicina (40 mg).....	1,0 mL
Solução balanceada de Hanks 1 x concentrada.....	3,0 mL

Preparo:

Misturar o conteúdo de uma ampola com 3 mL de solução balanceada de Hanks 1 x concentrada. Armazenar em congelador a -20°C. Utilizar 0,05 mL para cada 100 mL de meio de cultura.

4.4.4 Solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 7,5%

Fórmula:

Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃).....	75,0 g
Água bidestilada.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 75,0g de bicarbonato de sódio e diluir em 1 000 mL de água bidestilada fria, com agitação constante até completa dissolução. Esterilizar por filtração (item 4.6.1). Distribuir em volumes de 100 mL e efetuar prova de esterilidade (Anexo A), de cada frasco de solução no final da distribuição. Armazenar em refrigerador de 2 a 8°C.

4.4.5 Solução de ATV (associação de tripsina 0,20% e versene 0,02%)

Nota: Esta solução é composta pelas soluções A, B, C e D.

4.4.5.1 Solução A - Solução salinaFórmula:

Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	80,0 g
Cloreto de potássio (KCl) p.a.....	2,0 g
Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O).	29,0 g
Fosfato de potássio monobásico anidro (KH ₂ PO ₄).....	2,0 g
Água bidestilada q.s.p.....	10.000,0 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e dissolver cada um dos componentes em 10 000 mL de água bidestilada, com agitação constante até completa dissolução.

4.4.5.2 Solução B - TripsinaFórmula:

Tripsina 1:250.....	20,0 g
Solução A (item 4.4.5.1) q.s.p.....	500,0 mL

Preparo:

Pesar 20,0 g de tripsina e dissolver em 500 mL de solução salina e deixar agitando em banho de gelo durante 3 horas. A seguir, filtrar em papel filtro.

4.4.5.3 Solução C - VerseneFórmula:

Versene titriplex III ou EDTA p.a.....	2,0 g
Solução A (item 4.4.5.1) q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 2 g de versene titriplex III ou EDTA e dissolver em 100 mL de solução salina, com agitação constante até completa dissolução.

4.4.5.4 Solução D - Vermelho de fenol a 1%Fórmula:

Vermelho de fenol.....	1,0 g
Água bidestilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 1,0 g de vermelho de fenol e dissolver em 100 mL de água bidestilada, acrescentando 2 a 3 gotas de NaOH 6 N.

4.4.5.5 Preparo final da solução de ATV (associação de tripsina 0,20% e versene 0,02%)

Misturar sob agitação as soluções B e C à solução A, adicionando no final 15 mL da solução D. Esterilizar por filtração (item 4.6.1). Distribuir a solução filtrada em volumes de 500 mL e efetuar prova de esterilidade, colocando todos os frascos à temperatura de 35°C durante 24-48 horas. Armazenar em congelador a -20°C.

4.4.6 Álcool a 70%Fórmula:

Álcool etílico comercial..... 700,0 mL
 Água destilada q.s.p..... ±300,0 mL

Preparo:

Medir 700,0 mL de álcool etílico comercial em recipiente adequado e adicionar uma quantidade de água (aproximadamente 200 a 300 mL) suficiente para obter uma solução com teor de 70% de álcool. Essa verificação é feita através do uso do alcoômetro.

4.4.7 Solução de ácido cítrico 0.1 MFórmula:

Ácido cítrico..... 2,1 g
 Água bidestilada q.s.p..... 100,0 mL

Preparo:

Pesar 2,1 g de ácido cítrico e dissolver em 50-60 mL de água bidestilada. Completar o volume para 100 mL.

4.4.8 Corante para contagem de célulasFórmula:

Violeta genciana (cristal)..... 0,1 g
 Solução de ácido cítrico 0,1 M..... 100 mL

Preparo:

Pesar 0,1 g de violeta genciana e dissolver em 100 mL de solução de ácido cítrico 0,1 M. Filtrar em papel filtro. Guardar em frasco âmbar, de rolha esmerilhada.

4.5 Meios de cultura4.5.1 Caldo de soja e triptona (Tryptic Soy Broth - TSB)Fórmula:

Triptona..... 17,0 g
 Peptona de soja..... 3,0 g
 Dextrose..... 2,5 g
 Cloreto de sódio..... 5,0 g
 Fosfato de potássio dibásico..... 2,5 g
 Água destilada q.s.p..... 1 000,0 mL
 pH final após esterilização: 7,3 ± 0,1

Preparo:

Pesar 30,0 g de meio desidratado "Tryptic Soy Broth" e acrescentar 1 000,0 mL de água destilada fria. Aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução do meio, tomando cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH para 7,3 com solução normal de hidróxido de sódio. Distribuir volumes de 12,0 a 13,0 mL em tubos de 15 mm x 150 mm com tampa de rosca. Esterilizar por autoclavagem (item 4.6.2).

4.5.2 Meio Eagle (Eagle Minimum Essential Medium - MEM)

O meio de cultura Eagle é constituído de:

- duas soluções de aminoácidos (soluções A e B)
- três soluções de vitaminas (soluções C, D e E)
- bacto-dextrose
- solução de sais (solução balanceada de Earle)
- d-galactose
- triptose, sais e fosfatos
- l-glutamina
- vermelho de fenol a 1%.

4.5.2.1 Solução A - Aminoácidos

<u>Fórmula:</u>	<u>g/10L</u>
l-arginina . HCl.....	1,05 g
l-histidina . HCl.....	0,31 g
l-lisina . HCl.....	0,58 g
l-triptofano.....	0,10 g
l-fenilalanina.....	0,32 g
l-treonina.....	0,48 g
l-leucina.....	0,52 g
l-valina.....	0,46 g
l-iso-leucina.....	0,52 g
l-metionina.....	0,15 g

4.5.2.2 Solução B - Aminoácidos

<u>Fórmula:</u>	<u>g/10L</u>
l-tirosina.....	0,36 g
l-cistina.....	0,24 g

Preparo:

Pesar os dois aminoácidos e dissolver em 2 000 mL de HCl 0,75 N com leve aquecimento a 80°C em banho-maria ou sob leve agitação constante até a completa dissolução.

4.5.2.3 Solução C - Vitaminas

<u>Fórmula:</u>	
Nicotinamida.....	200 mg
Piridoxina . HCl.....	200 mg
Tiamina . HCl.....	200 mg
Pantotenato de cálcio.....	200 mg
Cloreto de colina.....	200 mg
i-inositol.....	400 mg
Riboflavina.....	20 mg

Preparo:

Pesar as vitaminas e dissolver em aproximadamente 175 mL de água bi destilada e, completar para um volume final de 200 mL de água bides tilada. Fracionar em volumes de 10 mL e armazenar em congelador a -20°C . A cada 10 litros de meio Eagle, adicionar 10 mL da Solução C.

4.5.2.4 Solução D - VitaminasFórmula:

Biotina..... 200 mg

Preparo:

Pesar 200 mg de biotina e dissolver em cerca de 150 mL de água bi destilada; para aumentar a estabilidade, acrescentar 1 mL de HCl e, completar para um volume final de 200 mL de água bidestilada. Fra cionar em volumes de 10 mL e armazenar em congelador a -20°C . A ca da 10 litros de meio de Eagle, adicionar 10 mL da solução D.

4.5.2.5 Solução E - VitaminasFórmula:

Ácido fólico (cristalino)..... 200 mg

Preparo:

Pesar 200 mg de ácido fólico e dissolver em cerca de 150 mL de solu ção salina de Hanks 1 x (item 4.4.1) e, completar para um volume fi nal de 200 mL com solução salina de Hanks. Fracionar em volumes de 10 mL e armazenar em congelador a -20°C . A cada 10 litros de meio Eagle, adicionar 10 mL da solução E.

4.5.2.6 Preparo da mistura final do meio Eagle em solução salina de Earle

- a) Os componentes a seguir são dissolvidos na solução B (i tem 4.5.2.2)
- | | <u>g/10 L</u> |
|--|---------------|
| Cloreto de sódio (NaCl)..... | 68,0 g |
| Cloreto de potássio (KCl)..... | 4,0 g |
| Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)..... | 2,0 g |
- b) 1,4 g de fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) é dissolvido em 550,0 mL de água bidestilada e adicionado no "pool" acima.
- c) 10,0 g de bacto-dextrose é dissolvido em 500,0 mL de água bidestilada e adicionar 200,0 mL da solução de vermelho de fenol (item 4.4.5.4) no "pool" (item a).
- d) o volume do "pool" é ajustado para 6 000,0 mL com água bidestilada e as seguintes soluções são adicionadas por 10 litros de meio Eagle

<u>Soluções</u>	<u>p/10 L de meio Eagle</u>
C.....	10,0 mL
D.....	10,0 mL
E.....	10,0 mL

- e) separadamente, em um frasco que contém 1 600,0 mL de água bidestilada dissolver 2,0g de cloreto de cálcio anidro (CaCl_2 anidro). Após dissolução, adicionar esta solução ao "pool" lentamente com "agitação vigorosa".
- f) os aminoácidos da solução A são adicionados no "pool" e o volume é ajustado aproximadamente para 9.500,0mL com água bidestilada. A mistura final do meio Eagle é mantida em refrigerador a 4°C durante a noite.
- g) decorrido este tempo, acrescentar ao meio Eagle:
- | | g/10 L |
|--|--------|
| l-glutamina..... | 0,3 g |
| d-galactose..... | 10,0 g |
| bacto-triptose..... | 20,0 g |
| bacto-dextrose..... | 2,0 g |
| cloreto de sódio (NaCl) p.a..... | 5,0 g |
| Fosfato de sódio dibásico dodecahidratado
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)..... | 2,5 g |
- h) o volume total é ajustado para 10 000,0 mL com água bidestilada. Esterilizar por filtração (item 4.6.1). Distribuir volumes de 500,0 mL e acrescentar em cada frasco 13,0-15,0 mL de bicarbonato de sódio a 7,5% (item 4.4.4) de forma a atingir pH 7,0-7,2. Efetuar prova de esterilidade, colocando todos os frascos à temperatura de 35°C durante 24-48 horas. Armazenar em congelador a -20°C.

4.6 Esterilização das soluções e meios de cultura

4.6.1 Filtração

A filtração de soluções ou de meios de cultura que contém substâncias termolábeis é feita com pressão positiva usando-se membranas de éster de celulose acopladas, com as seguintes porosidades: 0,45 μm e 0,22 μm . Membranas clarificantes de fibra de vidro podem também ser incluídas e, as de tipo AP-20 são as mais indicadas. A montagem das membranas deve ser feita obedecendo uma ordem decrescente de porosidade.

Todos os materiais e equipamentos utilizados para a filtração deverão ser esterilizados previamente por autoclavação a 121°C durante 30 minutos.

4.6.2 Autoclavação

Esterilizações de soluções ou de meios de cultura em autoclave devem ser feitos em temperatura de 121°C durante 15 minutos. Durante a autoclavação de meios de cultura, não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonação, caramelização ou outro tipo de destruição das

substâncias que constituem os meios de cultura.

4.6.3 Armazenamento de soluções

As soluções são armazenadas em refrigerador (2 a 8°C) ou em congelador (-20°C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolhas de borracha ou tampa com rosca, pois os tampões de algodão podem permitir a entrada e a conseqüente absorção de substâncias inespecíficas. Soluções alcalinas não devem ser estocadas em frascos de vidro por muito tempo, pois esses frascos são lentamente dissolvidos e íons de metais pesados são, posteriormente, encontrados nessas soluções.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

5.1.1 As células semeadas tendem a aderir à superfície interna dos frascos de cultura, achatando-se. Posteriormente, iniciam a multiplicação, formando uma camada celular contínua. Para esse crescimento celular são necessárias determinadas substâncias que devem estar presentes no meio de cultura, tais como aminoácidos, vitaminas, carboidratos, proteínas e sais que atuam na concentração hidrogeniônica promovendo o equilíbrio tampão (bicarbonato-fosfato) além de magnésio, ferro, cálcio, sulfato e carbonato. O cálcio e o magnésio têm papel importante no processo de adesão das células à superfície do vidro além do que o próprio cálcio está especificamente relacionado à alternância sol-gel do citoplasma; o ferro é utilizado em certas funções respiratórias; as pontes de fosfato controlam o metabolismo energético e os íons carbonato são essenciais em processos bioquímicos fundamentais.

Além disso, são necessários para a sobrevivência das células, o oxigênio e o gás carbônico, pois atuam no ciclo de Krebs. As células apresentam um ciclo de crescimento, no qual se distinguem as fases de latência, de multiplicação logarítmica, estacionária e de degeneração logarítmica (Figura 1).

5.1.2 Quando uma cultura é iniciada, ela passa primeiramente pela fase de latência, caracterizada por um índice de multiplicação baixo. Passa depois à fase logarítmica, nela permanecendo por algumas gerações. Quando a multiplicação cessa, fase estacionária, a troca de meio pode provocar o seu reinício. Todavia, a cultura logo atingirá a fase seguinte, de degeneração, se não for repicada. Recomenda-se, pois, que os repiques sejam realizados quando as culturas estão em fase logarítmica, de multiplicação ativa. Para se efetuar os

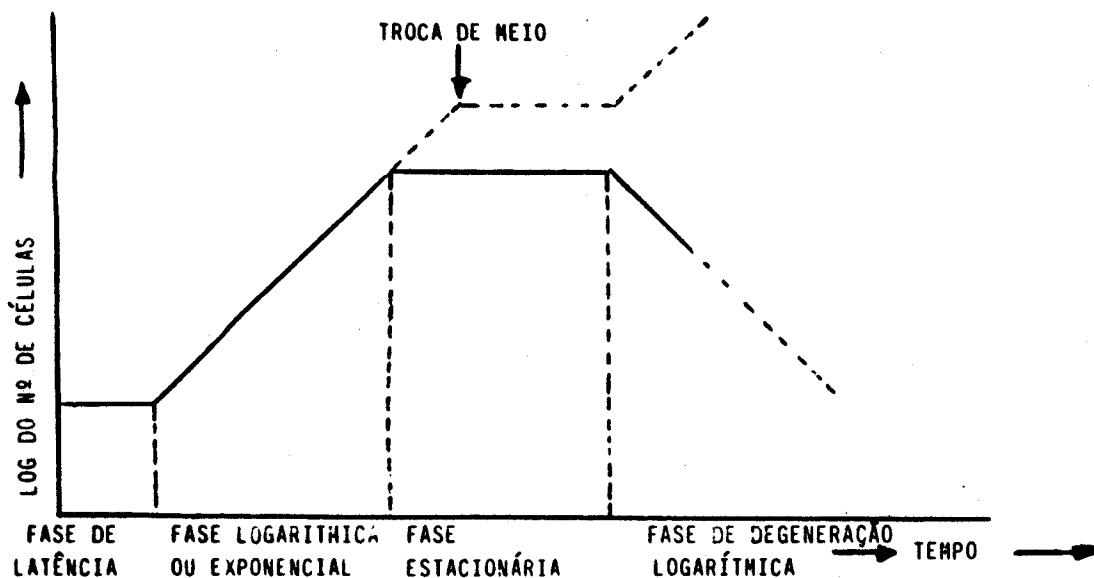


FIGURA 1 - Fases da curva de crescimento de células

repiques, usam-se agentes quelantes tais como versene (titriplex III ou EDTA) associados ou não a agentes enzimáticos como a tripsina. Estes 2 tipos de substâncias agem sobre o cimento celular que existe entre as células, dispersando-as: o versene liga-se aos cátions bivalentes (Ca^{+2} e Mg^{+2}) que são estabilizadores das ligações intercelulares, removendo-os das mesmas e, a tripsina atua sobre o cimento celular, degradando a proteína matriz que une as células.

5.2 Linhagens celulares

Para a realização das análises virológicas são utilizadas culturas celulares descritas nos itens de 5.2.1 a 5.2.3.

5.2.1 BS-C-1

Linhagem derivada de rim de macaco verde - Cercopithecus aethiops, morfologicamente epitelial, descrita inicialmente em 1961 por H.E. Hopps e colaboradores. A linhagem inicial do laboratório de virologia da CETESB foi procedente do "Environmental Protection Agency", EUA.

5.2.2 LLC.MK₂

Linhagem derivada de um "pool" de células preparado de rins de seis macacos Rhesus adultos - Macaca mulatta, morfologicamente epitelial descrita inicialmente por R.N. Hull e colaboradores. A linhagem inicial do laboratório de virologia da CETESB foi procedente do "American Type Culture Collection", EUA.

5.2.3 HEp-2

Linhagem derivada de carcinoma epidermoide de laringe humana em 1952. A linhagem inicial do laboratório de virologia da CETESB foi procedente do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

5.2.4 HeLa

Linhagem derivada de carcinoma epitelióide de cervix humano, isolada por G.O. Gey e colaboradores em 1951. Alguns anos atrás foi efetuado novo exame, por Jones e colaboradores que diagnosticaram o tumor como um adenocarcinoma. Desde sua origem, esta linhagem vem sendo muito estudada e discutida. A linhagem inicial do laboratório de virologia da CETESB foi procedente do "American Type Culture Collection", EUA.

5.2.5 BGM

Linhagem derivada de rim de macaco verde - Cercopithecus aethiops, morfológicamente epitelial, descrita inicialmente em 1971 por A. Barron da "State University of New York at Buffalo". A linhagem inicial do laboratório de virologia da CETESB foi procedente do Instituto Nacional de Saúde Pública e Meio ambiente (RIVM), da Holanda.

5.2.6 RD

Linhagem derivada de um rabdiosarcoma humano, em 1968. A linhagem inicial do laboratório de virologia da CETESB foi procedente do "American Type Culture Collection", EUA.

5.3 Procedimento

Os repiques das culturas celulares devem ser realizados em local com assepsia, isto é, em câmara de fluxo laminar.

5.3.1 Repique de frascos de cultura (semente)

5.3.1.1 Fazer a assepsia da boca do frasco de cultura e da rolha, passando uma gaze umedecida em álcool etílico a 70% e flambagem.

5.3.1.2 Decantar o meio de cultura em um frasco tipo erlenmeyer de vidro neutro estéril.

5.3.1.3 Descolar a monocamada de células das paredes dos frascos da seguinte forma:

- a) adicionar 5 mL de A.T.V. ao frasco e banhá-lo internamente com o mesmo;
- b) repousar o frasco, deixando que o A.T.V. atue sob a camada celular durante aproximadamente 2 minutos para lavar a monocamada celular;

- c) decantar o A.T.V. que foi utilizado, colocar 2,5 mL de A.T.V. novo sob a cultura para que ocorra o descolamento celular;
- d) após 10-15 minutos, agitar cuidadosamente o frasco que está em processo de tripsinização para auxiliar o descolamento das células;
- e) homogeneizar as células descoladas, pipetando a cultura celular descolada com 5 mL de meio de crescimento do frasco novo;
- f) colocar a quantidade de meio de crescimento (item 3.9) correspondente a todos os frascos novos (cerca de 25 mL de meio por frasco);
- g) transferir 2,5 mL da suspensão celular para o novo frasco que contém 25 mL de meio de crescimento (item 3.9)
- h) homogeneizar a suspensão total com pipeta, cuidando so mente para evitar a formação de espuma;
- i) após homogeneização, efetuar novamente a assepsia com álcool 70% e/ou flambagem da boca do frasco de cultura e arrolhar o frasco com rolha nova;
- j) incubar a 35°C para que as células adiram ao vidro e i niciem a multiplicação até formarem uma monocamada, o que geralmente ocorre em 3-4 dias.

A relação de divisão para o repique das diferentes culturas celulares é a seguinte:

A partir de um frasco de cultura (semente) com área de a proximadamente 44 cm², ao se efetuar o repique, a suspensão celular deverá ser dividida para dois frascos novos para se obter monocamadas confluentes em aproximadamente 4 dias.

5.3.2 Repique de culturas em garrafas de Roux (209 cm²)

Culturas em garrafas de Roux são utilizadas quando se deseja obter grande quantidade de células que seja para preparação de tubos ou garrafas tipo cultex.

O repique de culturas em garrafas de Roux é efetuada a partir de frascos de cultura (semente), usando-se geralmente duas para cada garrafa de Roux. Para tal, seguir o procedimento normal de repique de frascos de cultura (item 5.3.1) colocando 80-90 mL de meio de crescimento (item 3.9) para cada garrafa de Roux.

5.3.3 Repiques de culturas em tubos de ensaio

Culturas em tubos são usadas para realizar passagens de adaptação e

multiplicação de vírus, titulações, neutralizações, identificações, etc. É preferível prepará-las a partir de células que estejam sendo cultivadas em garrafas de Roux, porque, se o fossem a partir de frascos menores, tipo semente, haveria maior número de manobras e, conseqüentemente, maior risco de contaminação.

Para preparar os tubos, submeter as garrafas ao procedimento normal de repique de frasco de cultura até o item 5.3.1.3 e, calculando que de cada Roux podem ser preparados cerca de 200 tubos. A suspensão total de células deve ser preparada em um frasco com meio de crescimento (item 3.9) considerando que, em cada tubo são semeados 2 mL da suspensão celular. A semeadura é feita com seringa automática.

5.3.4 Repique de culturas em garrafas tipo cultex

Culturas em garrafas cultex são utilizadas para inoculações de amostras. São preparadas a partir de garrafas de Roux com monocamadas bem confluentes (crescimento de 5 a 6 dias). De cada Roux podem ser preparadas 15 a 20 garrafas tipo cultex nas quais são semeadas 15 mL da suspensão celular, com procedimento semelhante ao repique de culturas em tubos de ensaio.

5.3.5 Contagem de células

Quando for necessário calcular a concentração de uma suspensão celular, realiza-se uma contagem pois esta avalia o número de células existentes em cada mL da suspensão. Para tal, seguir a técnica de repique de frascos de cultura (semente) até o item 5.3.1.3d e depois, a seguinte seqüência:

- a) homogeneizar as células descoladas, pipetando-as com 10 mL de meio de crescimento;
- b) colocar 1,0 mL desta suspensão em um tubo ou flaconete e acrescentar 2,0 mL de corante (item 4.4.8) deixando em contato durante 5 minutos (diluição 1:3);
- c) após a homogeneização da suspensão celular com o corante, preencher o retículo da câmara de Neubauer sem excesso, com uma pipeta especial para contagem de glóbulos brancos;
- d) proceder à contagem das células, ao microscópio comum, nos retículos de contagem dos glóbulos brancos que são em número de 8. A contagem das células que estiverem sobre as linhas divisórias do retículo deve ser feita em apenas duas delas (por exemplo: a superior e lateral direita). O número de células viáveis presentes em cada mL da suspensão celular é calculado pela média aritmética das células presentes nos quadrantes, multiplicando-se o número obti

do pelo fator de diluição 3 e a seguir por 10 000, para se obter a concentração final das células, em mL.

5.4 Congelamento de células

O congelamento permite armazenar culturas celulares por longos períodos de tempo em temperaturas baixas, geralmente -196°C , temperatura essa fornecida pelo nitrogênio líquido, conservado em tambores especiais. Dentre os aditivos ou preservativos mais empregados estão o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO). Estes tipos de substâncias não devem ser tóxicos para as células, devem ligar-se à água, e penetrar facilmente nelas, para preservar a estrutura celular durante o congelamento.

5.4.1 A concentração da suspensão celular a ser congelada deve ser alta, proveniente de uma cultura celular confluenta, isto é, cerca de 5 vezes a concentração normal de uma cultura celular confluenta.

5.4.2 O meio de cultura utilizado é o meio de crescimento (3.9) com 15% de glicerol p.a.

5.4.3 Procedimento

5.4.3.1 Repicar uma garrafa tipo Roux de uma determinada linhagem celular que esteja na fase de crescimento logarítmico.

5.4.3.2 Suspender as células descoladas em 10,0 mL de meio de crescimento (item 3.9) e centrifugar a 1 000 rpm durante 15 minutos para eliminar a solução ATV.

5.4.3.3 Decantar o sobrenadante da centrifugação.

5.4.3.4 Ressuspender o sedimento em volume apropriado de meio de cultura (cerca de 4 mL).

5.4.3.5 Efetuar a contagem das células (item 5.3.5) e preparar uma suspensão de 2 000 000 - 5 000 000 células/mL em meio de crescimento (item 3.9). Geralmente, uma garrafa tipo Roux é suspensa em 8,5 mL de meio de crescimento, acrescentando-se gota a gota e com homogeneização 2,5 mL de glicerol p.a. previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos.

5.4.3.6 Distribuir 2,0 mL da suspensão celular por ampola de vidro resistente. É aconselhável distribuir a suspensão com seringa hipodérmica e cânula longa para evitar molhar o gargalo da ampola com a suspensão.

5.4.3.7 Ao final da distribuição, separar alíquota para teste de esterilidade da suspensão celular (Anexo A).

5.4.3.8 Selar as ampolas e imergi-las por 10' em solução álcool +

+ corante (violeta cristal, azul de metileno, etc) para verificar se estão bem vedadas. Desprezar as ampolas em que o corante tenha penetrado.

5.4.3.9 Colocar legendas precisas em cada ampola (nome da linhagem, nº da congelação, nº da passagem, meio utilizado, data da congelação).

5.4.3.10 Embrulhar bem as ampolas em papel e colocá-las em congelador a -70°C . Após 12 horas, transferí-las rapidamente para o tambor de nitrogênio líquido.

5.4.3.11 Manter o protocolo de registro das congelações de culturas celulares com o máximo de detalhes.

5.5 Descongelamento de células

As células de linhagem geralmente apresentam boa viabilidade após o processo de congelamento, mas será bom verificar, durante certos períodos de tempo de estocagem em nitrogênio líquido, se as células estão respondendo ao descongelamento, isto é, testar periodicamente as congelações quanto a sobrevivência celular.

5.5.1 Procedimento

5.5.1.1 Descongelar as células, retirando uma ampola do recipiente de nitrogênio líquido, usando máscara e luvas protetoras, colocando-as imediatamente em banho-maria a 37°C .

5.5.1.2 Fechar a tampa do banho-maria rapidamente e esperar alguns segundos, antes de começar a agitar a ampola vigorosamente para acelerar o descongelamento.

5.5.1.3 Desinfetar externamente a ampola com álcool 70%, serrar e quebrar a parte superior da ampola.

5.5.1.4 Retirar o conteúdo da mesma com auxílio de uma seringa hipodérmica com cânula e colocar em uma garrafa de cultura tipo cul tex que já contenha o meio de crescimento e incubar a 35°C .

5.5.1.5 Após 24-48 horas, trocar o meio de crescimento e aguardar o crescimento das células. Quando a cultura apresentar confluência, submetê-la aos repiques periódicos de manutenção.

5.5.1.6 Dar baixa no protocolo de registro das congelações de culturas celulares, anotando a data do descongelamento e o resultado obtido.

ANEXO A - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARESA-1 Ensaio de controleA-1.1 Teste de esterilidade

Após terem sido preparados, e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de cultura são rotineiramente testados, quanto à presença de fungos e/ou bactérias. Este teste consiste na inoculação de 1 mL do volume de cada frasco da solução em teste em 2 tubos de caldo de soja e triptona (4.5.1) os quais após semeadura são incubados a 35°C durante o mínimo de 48 horas (deve-se efetuar leituras diárias até completar 14 dias). Constitui evidência da presença de microrganismos qualquer turvação do caldo triptona-soja.

Essa contaminação pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação após a esterilização. Além disso, os frascos contendo as soluções ou meios de cultura permanecem por 14 dias à temperatura ambiente ao abrigo da luz, como teste adicional de esterilidade, antes de serem armazenadas em refrigerador (2 a 8°C).

A-1.2 Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular

Ver norma CETESB M1.002.

A-1.3 Controle de qualidade dos meios de cultura

Ver Norma CETESB L5.216.

A-1.4 Controle da qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada em laboratórios de virologia, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de testes específicos (ver Norma CETESB L5.212 - Prova de adequabilidade da água destilada para fins microbiológicos).

A-1.5 Controle da adequabilidade biológica da água bidestilada

Devem ser efetuados testes de adequabilidade biológica da água bidestilada para garantir a produção de uma água de alta qualidade livre de substâncias tóxicas ou nutrientes que possam interferir nos ensaios virológicos (ver Norma CETESB L5.215).

A-1.6 Armazenamento da água bidestilada

A água bidestilada deve ser armazenada em frascos limpos de vidro neutro, de preferência ao abrigo da luz e protegidos de pó ou vapores que possam ser produzidos no laboratório. O armazenamento pro

longado da água bidestilada deve ser evitado.

A-1.7 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-os entre os frascos ou os materiais a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria, a 55°C durante 24-48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-1.8 Controle de esterilidade de vidraria e materiais

É recomendável a realização de testes específicos para avaliar e comprovar a esterilidade de vidraria e materiais submetidos à esterilização em estufa a 170-180°C, ou em autoclave a 121°C. Para a realização deste teste, ver Norma CETESB L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água.

A-2 Local de trabalho

A-2.1 As capelas de segurança biológica devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido livres de poeiras, não deve haver movimentação excessiva do ar devido ao uso de ventiladores, exaustores, etc. conversa desnecessária deve ser evitada.

A-2.2 A limpeza da sala é feita após expediente diária sem varreções exageradas e, de preferência, empregando solução de formalina ou de outro desinfetante. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente. No fim da semana realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive do teto e das paredes. Após a limpeza, o ambiente é impregnado com formol puro, que é colocado em placas de Petri, para evaporar.

A-2.3 Se a capela estiver instalada em local com ar condicionado, a entrada de ar não deve ser dirigida diretamente sobre o campo de trabalho, a não ser que o condicionador tenha um filtro de ar especial.

A-3 Precauções

Dentre as pessoas que trabalham no laboratório, aquelas que tem menor tempo de treinamento e as que estão mais diretamente associadas à manobras com material infectado são as que apresentam maiores possibilidades de serem infectadas acidentalmente.

A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas através de pipetas, acidentes de centrifugação, etc., provocam, compro

vadamente, grande número de infecções acidentais e devem ser prevenidas pelo uso de máscaras descartáveis de papel, pipetadores e pela obediência às instruções específicas de trabalho e de uso do equipamento (ver Norma CETESB L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia).

A-3.1 Material de segurança

A-3.1.1 Aventais de plástico

Devem ser de plástico resistente e de comprimento adequado para a proteção do técnico durante os processos de lavagem.

A-3.1.2 Aventais de tecido

Para uso obrigatório por todos os técnicos na execução de quaisquer atividades laboratoriais. Antes do encaminhamento para lavagem, os aventais devem ser esterilizados em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

A-3.1.3 Luvas de amianto

A-3.1.4 Protetor facial

De utilização obrigatória (juntamente com máscara, com filtro adequado e luvas) no preparo de solução de ácidos a serem empregados na lavagem de materiais.

A-4 Transporte de culturas celulares

Quando for necessário transportar culturas celulares para lugares distantes, elas deverão estar em multiplicação ativa e ainda não confluentes. Deve-se trocar o meio de cultura no dia anterior ao do transporte ou imediatamente antes de transportar a cultura.

As culturas em monocamada são transportadas em garrafas de cultura ou em tubos de ensaio, totalmente cheias do meio de cultura específico, para evitar a agitação do líquido que poderia descolar as células do vidro. Podem assim permanecer de 2 a 3 semanas a 20°C.

O frasco contendo a cultura vai dentro de uma caixa de isopor que o protegerá de mudanças bruscas de temperatura, assim como de choques e quebras.

Chegando ao destino, o excesso de meio é cuidadosamente retirado e o frasco vai para a estufa. A utilização da cultura ou a sua replicação será feita quando a camada celular apresentar confluência.

O pH do meio de cultura utilizado no transporte das células, caso tenha mantido a neutralidade, poderá ser colhido com esterilidade e guardado para uso posterior caso as células não se adaptem ao novo

meio de cultura, nos primeiros repiques.

/ANEXO B

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Registry of animal cell lines. The Cell Culture Collection Committee. ed.
- B-2 DAVIS, B.D.; DULBECCO, R.; EISEN, H.N. & GINSBERG, H.S. Microbiology, Harper International Edition, 1980.
- B-3 DAHLING, D.R.; BERG, G.S.; BERMAN, D. BGM a continuous cell line more sensitive than primary Rhesus and African green kidney cells for the recovery of viruses from water. Health Lab. Sci, 11: 275-282, 1974.
- B-4 DAHLING, D.R.; SAFFERMAN, R.S. & WRIGHT, B.A. Results of a survey of BMG cell culture practices, Environ.Int., 10: 309-313, 1984.
- B-5 KRUSE Jr., P.F. & PATTERSON Jr., M.K. Tissue culture - methods and applications. Academic Press Inc., New York, 1973.
- B-6 LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5^{ed}. APHA, Washington, 1979.
- B-7 MARTINS, M.T.; SOARES, Z.A.; MOLINA, A.G. & RIZZO, E. Sensibilidade de diferentes linhagens celulares na detecção de enterovirus humanos presentes em água. Rev.Microbiol., São Paulo, 13(2):166-172, 1982.
- B-8 PAL, S.R. A comparative study of susceptibility of primary monkey kidney cells, HEp2 cells and HeLa cells to a variety of faecal viruses. J.Hyg.Comb., 61:493-498, 1963.
- B-9 PAUL, J. Cell and tissue culture. London & Livingstone, 1970.
- B-10 SCHMIDT, N.J.; HO, H.H.; RIGGS, J.L. & LENNETTE, E.H. Comparative sensitivity of various cell culture systems for isolation of viruses from wastewater and fecal sample. Appl. Environ.Microbiol., 36:487-491, 1978.