



NORMA TÉCNICA

M1.001

Nov/1986
34 PÁGINAS

Lavagem, preparo e estabilização de materiais em laboratórios de microbiologia: 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: // W W W . c e t e s b . s p . g o v . b r](http://WWW.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	LAVAGEM, PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS EM LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA Procedimento	M1.001 NOV/86
--------	---	----------------------

<u>SUMÁRIO</u>	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	4
5 Execução do ensaio.....	7
Anexo A - Procedimentos complementares.....	23
Anexo B - Recomendações de ordem geral.....	29
Anexo C - Referências bibliográficas.....	33

INTRODUÇÃO

A lavagem, preparo e esterilização de vidraria e outros materiais constituem um conjunto de atividades desenvolvidas como suporte aos vários processos de análises microbiológicas e é de fundamental importância que se tomem cuidados especiais em sua execução e se desenvolva um programa de controle de qualidade para avaliar a adequação dos métodos e procedimentos empregados, visando garantir a confiabilidade dos dados analíticos gerados no laboratório.

Nesse sentido, materiais de laboratório - englobando vidraria, materiais plásticos e determinados equipamentos - que não estejam quimicamente limpos, podem determinar perdas consideráveis, incluindo perda de tempo e invalidando dados analíticos em laboratórios de microbiologia. Um fato que deve ser considerado é que contaminantes químicos que podem afetar adversamente os resultados de análises microbiológicas usualmente são de difícil detecção através de uma simples inspeção visual e, em decorrência disto, é fundamental que uma atenção especial seja dada a todo processo de lavagem de materiais. Isso requer treinamento adequado dos técnicos responsáveis pela execução dessas tarefas e é imperativo que o supervisor destas atividades compreenda a necessidade de materiais não apenas limpos mas quimicamente limpos para uso no laboratório. Nesse sentido, supervisores competentes, cientes dessa necessidade, podem conseguir a qualidade de limpeza que é requerida em laboratórios de microbiologia, mesmo trabalhando com pessoal de diferentes níveis de escolaridade. Ainda em relação à lavagem de materiais, é fundamental também a seleção ade

quada do detergente a ser utilizado, considerando que alguns deles podem ter influência no crescimento de microrganismos e, caso não sejam totalmente removidos da vidraria, poderão comprometer a qualidade das análises.

Quanto à esterilização, é requerida a seleção adequada do processo a ser empregado em função do tipo de material a ser esterilizado, bem como a avaliação da eficiência desses processos.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os procedimentos para lavagem, preparo e esterilização de vidraria e outros materiais utilizados em laboratórios de análises microbiológicas de amostras ambientais (água, esgoto, sedimento, etc).

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- a) L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia;
- b) L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises bacteriológicas de água;
- c) L5.011 - Ensaio para verificar a toxicidade de detergentes para lavagem de material de laboratório;
- d) L5.201 - Contagem de bactérias heterotróficas;
- e) L5.215 - Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos;
- f) L5.216 - Controle de qualidade de meios de cultura.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta norma são adotadas as definições 3.1 a 3.9.

3.1 Descontaminação prévia do material

Atividade obrigatória a ser realizada antes da lavagem de toda a vidraria e outros materiais que foram utilizados na realização de análises microbiológicas. A execução dessa atividade é imperativa para garantir a segurança dos técnicos responsáveis pela lavagem e evitar a contaminação dos corpos receptores nos quais são lançados os despejos da lavagem desses materiais. É efetuada usualmente através de autoclavação desse material a 121°C durante 30 minutos. Para itens não resistentes à autoclavação, utilizar um processo de desinfecção adequado.

3.2 Lavagem

Operação de limpeza, realizada manual ou mecanicamente, para a remoção completa de quaisquer resíduos que permaneçam aderidos ao material após o seu uso.

3.3 Preparo do material

Conjunto de atividades executadas após a lavagem do material e antes de sua esterilização e que são específicas para cada material em função de sua utilização posterior. Inclui o acondicionamento adequado do material para sua esterilização.

3.4 Esterilização

Processo através do qual são destruídos todos os organismos vivos presentes em um determinado meio ou material (vírus, protozoários e formas vegetativas ou esporuladas de bactérias e fungos).

3.5 Esterilização por calor seco

Processo baseado na exposição do material ao ar quente, provocando a morte dos microrganismos devido à desnaturação de suas proteínas. Para esse processo são empregadas estufas de esterilização, com exposição do material a temperaturas de 170 a 180°C durante duas horas.

3.6 Esterilização por calor úmido

Processo baseado na combinação de temperatura elevada com alto grau de umidade, provocando a morte dos microrganismos por desnaturação de suas proteínas. O processo mais empregado é a autoclavação, com exposição do material à temperatura de 121°C durante 15 minutos.

3.7 Esterilização por radiações ultra-violeta

Processo baseado na exposição do material à radiação ultra-violeta, determinando a morte dos microrganismos provavelmente devido à destruição fotoquímica de seus ácidos nucleicos.

3.8 Esterilização por microondas

Processo baseado na exposição do material a microondas com frequência de 2450 MHz (forno de microondas), que causam a morte dos microrganismos.

3.9 Detergentes

Substâncias orgânicas sintéticas, que têm ação limpadora como os sabões, devido à combinação de uma série de propriedades, entre as quais se incluem: decréscimo da tensão superficial, ação umectante, emulsificante, dispersante e formação de espuma. O ingrediente básico dos detergentes é uma substância orgânica com propriedade tensoativa de superfície em soluções aquosas, que é chamado de agente surfactante.

O detergente a ser utilizado na lavagem de materiais e vidraria de verá ser previamente testado para verificar sua adequação ao uso em laboratórios de microbiologia (ver Norma CETESB/L5.011).

4 APARELHAGEM

4.1 Materiais e equipamentos para o processo de descontaminação pré via do material

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, 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 na 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. É aconselhável que o laboratório disponha de uma autoclave a ser utilizada especificamente para esterilização de materiais contaminados e outra, para esterilização de materiais recém-preparados e meios de cultura e soluções.

4.1.2 Caixas de aço inoxidável

Devem ser vazadas, com tampa e alça, e ter dimensões adequadas para o acondicionamento de materiais que serão esterilizados em autoclave. Usar caixas não vazadas para esterilização de vidraria que será autoclavada em solução de detergente (placas de Petri de vidro, pipetas).

4.1.3 Alcoômetro

Empregado para preparo de álcool a 70% a ser utilizado na descontaminação de itens plásticos não resistentes à autoclavagem.

4.2 Materiais e equipamentos para lavagem de materiais

4.2.1 Lavador mecânico de vidraria

Construído geralmente de aço inoxidável, equipado com vários acessórios que permitem acomodar diversos tipos de vidraria. Realiza ciclos de lavagem, drenagem e enxágüe automaticamente.

4.2.2 Lavador automático de pipetas

Construído em plástico rígido ou em aço inoxidável e resistente à ação das soluções utilizadas na lavagem. O conjunto se compõe de dois

depósitos: uma cesta e um sifão lavador. O depósito do sifão tem duas conexões, sendo uma ligada diretamente à entrada de água corrente e a outra, ao esgoto.

4.2.3 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação bacteriana, que será utilizada para o enxágue final da vidraria.

4.2.4 Detergente

Deve ser livre de fosfatos e sua adequação ao uso em laboratórios de microbiologia deve ser testada previamente (ver Norma Técnica CETESB L5.011).

4.2.5 Gaspilhões

De tamanhos diversos.

4.2.6 Esponjas de espuma

4.3 Materiais para o preparo de vidraria

4.3.1 Algodão hidrófobo

4.3.2 Algodão hidrófilo

4.3.3 Gaze hospitalar

4.3.4 Papel Kraft

4.3.5 Papel alumínio

4.3.6 Elástico

4.3.7 Estojos de aço inoxidável

De dimensões adequadas para o acondicionamento de pipetas a serem submetidas à esterilização por calor seco.

4.3.8 Caixas de aço inoxidável

Devem ser vazadas, com alça, e ter dimensões adequadas para acondicionamento de vidraria a ser esterilizada por calor seco.

4.4 Materiais e equipamentos para os processos de esterilização

4.4.1 Autoclave

Deve ter as características descritas no item 4.1.1.

4.4.2 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, placas de Petri, frascos para colheita e toda vidraria e aparelhagem 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 equi

pada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170°C a 180°C. O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 2 horas, à temperatura de 170°C a 180°C.

4.4.3 Forno de microondas

Deve ter dimensões adequadas para uso em laboratório, e emitir microondas com frequência de 2450 MHz. Deve atender ao padrão internacional que limita a densidade de potência a 1 mW/cm² a uma distância de 5 cm do forno.

4.4.4 Lâmpadas germicidas (ultra-violeta)

São lâmpadas que emitem radiações ultra-violeta, com ação germicida. São usadas para descontaminação de porta-filtros, entre as sucessivas séries de filtração, e para esterilização de placas de Petri de plástico não autoclavável usadas na técnica de membrana filtrante. Para a total eficiência do processo, devem ser observados os seguintes pontos:

- a) as superfícies a serem esterilizadas não devem conter resíduos de nenhuma espécie, pois a poeira acumulada diminui o poder germicida da lâmpada;
- b) a distância entre a lâmpada e a superfície a ser esterilizada deve ser a mínima possível;
- c) deve-se efetuar a limpeza das lâmpadas mensalmente, utilizando-se um pedaço de pano embebido em etanol;
- d) a eficiência da lâmpada germicida deve ser avaliada periodicamente (ver Anexo B.4.1.).

4.4.5 Bioindicador

Ampolas contendo esporos de Bacillus stearothermophilus em suspensão, a serem utilizadas no controle da eficiência do processo de esterilização em autoclave (ver Anexo B.2).

4.4.6 Fitas-controle dos processos de esterilização

Fitas especiais que apresentam faixas com material sensível ao calor, que mudam de cor em função da exposição a temperaturas elevadas. Devem ser usadas como um controle de que o material foi submetido à esterilização (calor seco ou calor úmido), mas a mudança de cor destas faixas não garante a eficiência do processo de esterilização.

4.5 Material de segurança

4.5.1 Aventais de plástico

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

4.5.2 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.

4.5.3 Luvas de amianto

4.5.4 Luvas de borracha

4.5.5 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.

4.5.6 Calçados de segurança

Calçados fechados ou botas plásticas de cano alto, para uso como proteção no processo de lavagem de materiais.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Reagentes

Para o preparo das soluções utilizadas na lavagem de vidraria e outros materiais e de soluções a serem adicionadas a materiais em seu preparo antes da esterilização, são os seguintes os reagentes necessários:

- a) ácido clorídrico fumegante (HCl a 37%) p.a.;
- b) ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico), p.a.;
- c) álcool etílico comercial;
- d) bicarbonato de sódio (NaHCO_3) p.a.;
- e) detergente líquido (Extran MA-01 alcalino, Teepol ou similar);
- f) formol comercial (formaldeído a 37%);
- g) hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- h) púrpura de bromocresol, p.a.;
- i) sulfito de sódio (Na_2SO_3) p.a.;
- j) tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) p.a.

5.2 Soluções

5.2.1 Soluções empregadas na lavagem de vidraria

5.2.1.1 Solução de detergente não tóxico a 0,1%

Fórmula:

Detergente líquido.....	1 mL
Água q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Medir o volume desejado de água e adicionar 1 mL de detergente para cada litro de água utilizado.

5.2.1.2 Solução de ácido clorídrico a 1% (ver Anexo A-2)

Fórmula:

Ácido clorídrico fumegante (HCl a 37%) p.a.....	10 mL
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Medir o volume desejado de água destilada em recipiente adequado e adicionar **vagarosamente** 10 mL de ácido clorídrico fumegante para cada 990 mL de água utilizados.

Nota: Adicionar o ácido à água e **nunca** a água ao ácido. Usar protetor facial, máscara com filtro adequado e luvas para o preparo dessa solução.

5.2.2 Soluções empregadas na descontaminação prévia de itens plásticos não autoclaváveis

5.2.2.1 Solução alcoólica de formol a 0,4%

Fórmula:

Formol (formaldeído a 37%).....	4 mL
Álcool etílico a 70% q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Medir o volume desejado de álcool etílico a 70% em recipiente adequado e adicionar 4 mL de formol para cada 996 mL de álcool utilizados.

5.2.2.2 Solução de álcool etílico a 70%

Fórmula:

Álcool etílico.....	700 mL
Água.....	± 300 mL

Preparo:

Medir 700 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.

5.2.3 Soluções para tratamento de tampas plásticas (ver Anexo A-1)

5.2.3.1 Solução de hidróxido de sódio 3N

Fórmula:

Hidróxido de sódio p.a.....	120 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 120 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Agitar até a completa dissolução do reagente.

5.2.3.2 Solução de ácido clorídrico 1N

Fórmula:

Ácido clorídrico fumegante (HCl a 37%) p.a.....	83,5 mL
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Medir 916,5 mL de água destilada em recipiente adequado e acrescentar **vagarosamente** 83,5 mL de ácido clorídrico fumegante. Para esse preparo, ver nota do item 5.2.1.2.

5.2.4 Soluções para tratamento de rolhas de borracha novas (ver Anexo A-3)

5.2.4.1 Solução de hidróxido de sódio a 0,4%

Fórmula:

Hidróxido de sódio.....	4 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 4 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Homogeneizar até a completa dissolução do reagente.

5.2.4.2 Solução de ácido clorídrico a 0,4%

Fórmula:

Ácido clorídrico fumegante (HCl a 37%).....	4 mL
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Medir o volume desejado de água em recipiente adequado e adicionar **vagarosamente** 4 mL de ácido clorídrico fumegante para cada 996 mL de água utilizados. Para esse preparo, ver nota do item 5.2.1.2.

5.2.4.3 Solução de bicarbonato de sódio a 4%

Fórmula:

Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃).....	40 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 40 g de bicarbonato de sódio, colocar em um balão volumétrico com aproximadamente 500 mL de água destilada, agitar até a completa dissolução e completar o volume para 1 000 mL com água destilada.

5.2.5 Soluções empregadas no procedimento de recuperação de membranas filtrantes (ver Anexo A-5)

5.2.5.1 Solução de sulfito de sódio a 10%

Fórmula:

Sulfito de sódio.....	100 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 100 g de sulfito de sódio, colocar em um balão volumétrico com aproximadamente 500 mL de água destilada, agitar até a completa dissolução e completar o volume para 1 000 mL com água destilada.

5.2.5.2 Solução de ácido clorídrico a 3%

Fórmula:

Ácido clorídrico fumegante (HCl a 37%).....	30 mL
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Medir o volume desejado de água destilada em recipiente adequado e adicionar **vagarosamente** 30 mL de ácido clorídrico fumegante para cada 970 mL de água utilizados. Para esse preparo, ver nota do item 5.2.1.2.

5.2.6 Soluções a serem adicionadas aos frascos de colheita de amostras (ver Anexo B-6)

5.2.6.1 Frascos para colheita de águas tratadas

Solução de tiosulfato de sódio a 1,8%

Fórmula:

Tiosulfato de sódio. ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) p.a.....	18,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 18 g de tiosulfato de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do reagente. Armazenar em frasco bem vedado.

5.2.6.2 Frascos para colheita de águas brutas

a) Solução de EDTA a 15%

Fórmula:

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico) p.a.....	150 g
Água destilada q.s.p.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 150 g de EDTA, colocar em um balão volumétrico contendo aproximadamente 500 mL de água destilada, agitar até a completa dissolução e completar o volume para 1 000 mL com água destilada.

b) Solução de tiosulfato de sódio de sódio a 10%**Fórmula:**

Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) p.a..... 100 g
Água destilada q.s.p.....1 000 mL

Preparo:

Pesar 100 g de tiosulfato de sódio, colocar em um balão volumétrico contendo aproximadamente 500 mL de água destilada, homogeneizar bem até a completa dissolução do reagente e completar o volume para 1 000 mL com água destilada.

5.3 Execução do ensaio

Os procedimentos de lavagem, preparo e esterilização serão descritos neste capítulo especificamente em relação a cada tipo de vidraria ou material de uso comum em laboratórios de microbiologia.

5.3.1 Frascos para coleta de amostras, de vidro plástico autoclavável**5.3.1.1 Descontaminação prévia**

- a) Antes da autoclavação, afrouxar as tampas dos frascos para permitir a entrada do vapor e evitar a deformação dos frascos plásticos durante o processo de esterilização.
- b) Descontaminar em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

5.3.1.2 Lavagem e secagem

- a) Após a descontaminação, esvaziar o conteúdo dos frascos.
- b) Com auxílio de uma esponja, limpar a parte externa dos frascos para retirar as marcações efetuadas para identificação da amostra contida no frasco.
- c) Escovar cuidadosamente o interior dos frascos, com auxílio de um gaspilhão previamente embebido em solução de detergente a 0,1%.
- d) Enxagüar 10 vezes em água corrente, enchendo e esvaziando totalmente os frascos, tomando cuidado de verificar se realmente os frascos estão completamente cheios e vazios em cada enxagüe.
- e) Efetuar um enxagüe final com água destilada ou desionizada, escoando bem a água.

- f) Acondicionar os frascos em posição vertical e com o bocal voltado para baixo em caixas vazadas de aço inoxidável, para secagem em estufa a 80-100°C durante 1 hora.

5.3.1.3 Preparo

Adicionar aos frascos as seguintes soluções:

- a) frascos para colheita de águas tratadas
- adicionar ao frasco 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL da amostra a ser colhida.
- b) frascos para colheita de águas brutas
- adicionar ao frasco 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA e 0,1 mL de uma solução a 10% de tiossulfato de sódio para cada 100 mL de amostra a ser colhida (ver Anexo B-6).
 - tampar e colocar sobre a tampa de cada frasco um pedaço de papel alumínio ou papel Kraft, de tal modo que a tampa e o gargalo dos frascos fiquem bem protegidos.
- Obs.:Efetuar marcações distintas para identificação dos frascos para águas tratadas e para águas brutas.

5.3.1.4 Esterilização

- a) Frascos de plástico autoclavável ou de vidro com tampa de rosca
- esterilizar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos, com a tampa apenas levemente rosqueada, para permitir o equilíbrio da pressão e evitar a deformação dos frascos plásticos;
 - imediatamente após a esterilização, rosquear completamente a tampa do frasco e passar um elástico para fixar a proteção de papel alumínio ou papel Kraft colocada sobre a tampa.
- b) Frascos de vidro com tampa esmerilhada
- antes da esterilização, colocar um calço de material não tóxico (papel Kraft ou similar) sob a tampa, para permitir a entrada de ar quente e facilitar a abertura posterior do frasco.
 - esterilizar por calor seco em estufa de esterilização à temperatura de 170 a 180°C, durante 2 horas.

5.3.1.5 Armazenamento

Os frascos podem ser armazenados no máximo durante 2 semanas após sua esterilização, em local limpo e livre de poeira.

5.3.2 Frascos de água de diluição

5.3.2.1 Descontaminação prévia

- a) após a utilização, manter as tampas dos frascos apenas levemente rosqueadas para permitir a entrada de vapor durante o processo de descontaminação;
- b) acondicionar os frascos em posição vertical em caixas vazadas de aço inoxidável;
- c) descontaminar em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

5.3.2.2 Lavagem e secagem

- a) após a descontaminação, esvaziar o conteúdo dos frascos;
- b) com auxílio de uma esponja, limpar a parte externa dos frascos, para retirar as marcações efetuadas para identificação da diluição contida no frasco;
- c) escovar cuidadosamente o interior de cada frasco, com auxílio de um gaspilhão previamente embebido em solução de detergente a 0,1%;
- d) enxagüar 10 vezes em água corrente, enchendo e esvaziando totalmente os frascos, tomando cuidado de verificar se os frascos estão totalmente cheios e vazios em cada enxagüe;
- e) efetuar um enxagüe final com água destilada ou desionizada, escoando bem a água;
- f) acondicionar os frascos em posição vertical e com o bocal voltado para baixo em caixas vazadas de aço inoxidável, para secagem em estufa a 80-100°C durante 1 hora, ou à temperatura ambiente.

5.3.2.3 Esterilização

- a) após a secagem, esses frascos são utilizados para distribuição de água de diluição a ser utilizada em análises microbiológicas, e sua esterilização final é feita em autoclave a 121°C durante 15 minutos, por ocasião da esterilização da água de diluição neles contida;

5.3.3 Tubos de ensaio

5.3.3.1 Descontaminação prévia

- a) Tubos de ensaio contendo meio líquido
 - acondicionar os tubos de ensaio verticalmente e com o bocal voltado para cima, em caixas vazadas de aço inoxidável;
 - descontaminar em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

- b) Tubos de ensaio contendo meio sólido
- acondicionar os tubos de ensaio verticalmente e com o bocal voltado para baixo em caixas vazadas de aço inoxidável;
 - descontaminar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos.

5.3.3.2 Lavagem e secagem

- a) após a descontaminação, esvaziar o conteúdo dos tubos (obs: se foram utilizados tubos de fermentação no interior dos tubos de ensaio, efetuar a separação dos mesmos);
- b) imergir os tubos de ensaio em recipiente de aço inoxidável contendo solução de detergente a 0,1%;
- c) ferver durante 15 minutos, para eliminar os resíduos de meios de cultura aderidos à parede dos tubos;
- d) caso persistam os resíduos após a fervura, escovar individualmente e cuidadosamente a parte interna de cada tubo com auxílio de um gaspilhão;
- e) enxaguar 10 vezes com água corrente, enchendo e esvaziando totalmente os tubos;
- f) efetuar um enxágüe final com água destilada ou desionizada, escorrendo bem a água;
- g) acondicionar os tubos em posição invertida em caixas vazadas de aço inoxidável para secagem em estufa 80-100°C durante 1 hora ou à temperatura ambiente.

5.3.4 Tubos de fermentação (tubos de Durhan)

5.3.4.1 Descontaminação prévia

- a) descontaminar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos, juntamente com os tubos de ensaio no interior das quais estão contidos (ítem 5.3.3.1).

5.3.4.2 Lavagem e secagem

- a) após a descontaminação, colocar os tubos de fermentação em recipiente de aço inoxidável contendo solução de detergente a 0,1%;
- b) ferver durante 15 minutos, para eliminar os resíduos de meios de cultura;
- c) enxaguar 10 vezes em água corrente;
- d) efetuar um enxágüe final com água destilada ou desionizada e escorrer bem a água;

- e) secar em estufa à temperatura de 80 a 100°C durante 1 hora.

5.3.4.3 Preparo

Colocar os tubos de fermentação em posição invertida, dentro dos tubos de ensaio que serão utilizados para análises microbiológicas específicas em que o resultado positivo no teste é evidenciado pela produção de gases (que serão retidos no tubo de fermentação).

5.3.4.4 Esterilização

É feita em autoclave a 121°C durante 15 minutos, por ocasião da esterilização do meio de cultura distribuído em tubos de ensaio contendo os tubos de fermentação.

5.3.5 Pipetas

5.3.5.1 Descontaminação

- a) acondicionar as pipetas horizontalmente em caixas de aço inoxidável, contendo solução de detergente a 0,1%.
- b) descontaminar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos.

5.3.5.2 Lavagem e secagem

- a) após a descontaminação, retirar o tampão de algodão hidrófobo colocado no bocal de cada pipeta (tomando cuidado para não quebrar o bocal). Essa operação pode ser feita com auxílio de vácuo ou estilete de ponta fina.
- b) acondicionar as pipetas horizontalmente em recipiente de aço inoxidável contendo solução de detergente a 0,1% e ferver durante 15 minutos.
- c) enxaguar 10 vezes em água corrente, enchendo e esvaziando totalmente as pipetas ou durante 2 horas no lavador de pipetas.
- d) efetuar um enxágue final com água destilada, escorrendo bem a água.
- e) secar em estufa à temperatura de 80 a 100°C durante 1 hora.

5.3.5.3 Preparo

- a) Após a secagem, tamponar o bocal das pipetas com algodão hidrófobo.
- b) Acondicionar as pipetas, com as pontas voltadas para baixo, em estojos de alumínio ou aço inoxidável, no fundo dos quais foi colocada uma almofada de algodão, para proteger as pontas contra quebras.

- c) Identificar, na parte externa do estojo, o volume das pipetas acondicionadas e a data de esterilização.

Nota: As pipetas também podem ser embrulhadas individualmente em papel Kraft.

5.3.5.4 Esterilização

Esterilizar por calor seco em estufa de esterilização à temperatura de 170 a 180°C, durante 2 horas.

5.3.6 Placas de Petri de vidro

5.3.6.1 Descontaminação

- a) Acondicionar separadamente tampas e fundos das placas de Petri em caixas de aço inoxidável já contendo solução de detergente a 0,1%.
- b) Descontaminar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos.
- c) Durante o processo de separação entre tampa e fundo das placas de Petri, recomenda-se ao operador o uso de máscara adequada e luvas.

5.3.6.2 Lavagem e secagem

- a) Após a descontaminação, lavar cuidadosamente cada tampa e fundo com auxílio de uma esponja embebida em solução de detergente a 0,1%.
- b) Enxagüar 10 vezes em água corrente, esfregando sempre, com a mão, as superfícies interna e externa de cada parte da placa. Tomar todas as precauções para que este enxágüe seja perfeito, de tal modo que todos os resíduos da superfície sejam eliminados.
- c) Efetuar em enxágüe final com água destilada ou desionizada e escorrer bem toda a água.
- d) Secar, separadamente, fundos e tampas em estufa, à temperatura de 80 a 100°C durante 1 hora, ou à temperatura ambiente.

5.3.6.3 Preparo

- a) Juntar tampa e fundo de cada placa, e agrupar no máximo 10 placas.
- b) Embrulhar em papel Kraft ou colocar em estojos adequados. Datar.

5.3.6.4 Esterilização

Esterilizar por calor seco em estufa à temperatura de 170 a 180°C durante 2 horas.

5.3.7 Placas de Petri de plástico não autoclavável usadas na técnica de membrana filtrante

5.3.7.1 Descontaminação

- a) com uma pinça, retirar a membrana e o meio de cultura contido na placa;
- b) acondicionar adequadamente esse material em saco plástico;
- c) embrulhar em papel Kraft;
- d) descontaminar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos;
- e) após a retirada da membrana e do meio de cultura, imergir separadamente tampas e fundos das placas de Petri em recipientes contendo solução alcoólica de formol a 0,4% e deixar durante 2 horas;
- f) após esse período, transferir tampas e fundos das placas de Petri, para recipientes separados contendo solução de álcool etílico a 70%, e deixar em imersão durante 2 horas.

Nota: Para placas de Petri em que não se observou nenhum crescimento de microrganismos, a etapa referente à imersão em solução alcoólica de formol pode ser suprimida.

5.3.7.2 Lavagem e secagem

- a) retirar tampas e fundos da solução de álcool etílico a 70% e colocá-los em solução de detergente a 3%, deixando em imersão durante 12 a 24 horas (tempo requerido para facilitar a remoção de resíduos dos meios de cultura das placas);
- b) após o período requerido na solução de detergente, lavar cuidadosamente cada parte da placa, com auxílio de uma esponja;
- c) enxaguar 10 vezes em água corrente, sempre esfregando com a mão as superfícies interna e externa das placas;
- d) efetuar um enxágue final com água destilada ou desionizada e escorrer bem a água.

5.3.7.3 Desinfecção

- a) imergir as tampas e fundos das placas de Petri, separadamente, em solução de álcool etílico a 70%, durante 1 hora;
- b) após esse período, retirar as tampas e fundos das placas de Petri e colocá-los sobre folhas de papel de filtro em local asséptico, para secagem à temperatura ambiente.

5.3.7.4 Esterilização

A esterilização pode ser realizada de duas maneiras que são descritas a seguir:

- a) esterilização por exposição a radiação ultra-violeta
 - após a secagem, expor as paredes internas do fundo e da tampa das placas de Petri à ação direta de radiações ultra-violeta, durante 2 horas (ver anexo B-4);
 - logo após a esterilização, fechar rapidamente, juntando a tampa e fundo sem tocar com a mão na superfície interna das placas;
 - acondicionar em caixas adequadas com tampa ou embrulhar com folhas de alumínio esterilizado. Datar;
 - armazenar em local limpo e livre de poeira, durante no máximo 2 semanas após a esterilização.
- b) esterilização por microondas
 - após a secagem, juntar tampa e fundo e acondicionar as placas de Petri em caixas (com tampa) de material plástico resistente à temperatura do forno de microondas. Colocar essas caixas fechadas no forno de microondas, evitando a sobrecarga dos mesmos;
 - a esterilização será realizada submetendo-se as placas de Petri de plástico a dois níveis de potência do forno de microondas:
 - . potência fraca: 2 minutos
 - . potência forte: 1 minuto
 - repetir essa operação 3 vezes consecutivas, deixando um intervalo adequado entre essas exposições (cerca de 20 minutos);
 - armazenar em local limpo e livre de poeira, durante no máximo 2 semanas após a esterilização.

5.3.8 Outras vidrarias de uso comum em laboratórios de microbiologia (provetas, béqueres, frascos Kitassato e Erlenmeyer, etc.)

5.3.8.1 Descontaminação prévia

Descontaminar em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

5.3.8.2 Lavagem e secagem

- a) após a descontaminação, esvaziar o conteúdo da vidraria;
- b) com auxílio de uma esponja, limpar a parte externa da vidraria, para retirar as marcações efetuadas, relativas a seu uso anterior;

- c) escovar cuidadosamente a parte interna da vidraria, com auxílio de um gaspilhão previamente embebido em solução de detergente a 0,1%;
- d) após a lavagem, enxaguar 10 vezes em água corrente, enchendo e esvaziando completamente a vidraria, tomando cuidado de verificar se a mesma está completamente cheia e vazia em cada enxagüe;
- e) efetuar um enxagüe final com água destilada ou desionizada, escoando bem a água;
- f) secar em posição invertida, em estufa à temperatura de 80 a 100°C durante 1 hora ou à temperatura ambiente.

5.3.8.3 Preparo

- a) recobrir a abertura da vidraria com papel alumínio;
- b) se requerido, acondicionar adequadamente em caixas vazadas de aço inoxidável.

5.3.8.4 Esterilização

Esterilizar por calor seco, em estufa de esterilização à temperatura de 170 a 180°C durante 2 horas.

5.3.9 Tampas metálicas ou de plástico autoclavável e rolhas de borracha

5.3.9.1 Descontaminação

A descontaminação é realizada juntamente com os tubos de ensaio ou frascos nas quais essas tampas ou rolhas foram utilizadas (itens 5.3.1, 5.3.2 e 5.3.3), sendo efetuada a sua separação após a esterilização.

5.3.9.2 Lavagem e secagem

- a) ferver as tampas ou rolhas em solução de detergente a 0,1%, durante 30 minutos;
- b) enxaguar 10 vezes em água corrente;
- c) enxaguar 1 vez em água destilada ou desionizada;
- d) escorrer bem a água;
- e) colocar sobre papel de filtro e deixar secar à temperatura ambiente ou secar em estufa à temperatura de 80 a 100°C durante 1 hora.

5.3.9.3 Preparo

- a) colocar as tampas plásticas ou metálicas no bocal de tubos de ensaio ou frascos para cujo tamponamento serão utilizadas;

- b) acondicionar as rolhas em recipiente adequado (estojo de aço inoxidável, béquer com o bocal revestido com pa pel alumínio ou papel Kraft, etc).

5.3.9.4 Esterilização

Esterilizar em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

5.3.10 Hastes de madeira empregadas na repicagem de culturas

5.3.10.1 Descontaminação

- a) após sua utilização na realização de análises, acondi-
cionar as hastes de madeira em recipiente adequado (cai-
xas de aço inoxidável, etc.) ou embrulhar em papel
Kraft;
- b) esterilizar em autoclave a 121°C durante 30 minutos;
- c) descartar.

Nota: Essas hastes **não** podem ser reutilizadas.

5.3.10.2 Preparo de hastes de madeira novas

- a) acondicionar as hastes de madeira (sem uso anterior) em
frascos de vidro de boca larga, e colocar uma proteção
de papel alumínio recobrimdo o bocal do frasco e as ex
tremidades das hastes de madeira;
- b) esterilizar por calor seco em estufa de esterilização
à temperatura de 170 a 180°C, durante 3 horas.

Nota: Não utilizar esterilização em autoclave para esta etapa, pois
as resinas liberadas na autoclavagem poderão interferir
nas análises.

- c) armazenar em local limpo e livre de poeira, durante no
máximo 2 semanas.

5.3.11 Funis de filtração de aço inoxidável, vidro ou plástico au- toclavável, usados na técnica de membrana filtrante

5.3.11.1 Descontaminação

Descontaminar em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

5.3.11.2 Lavagem e secagem

- a) desconectar a parte superior do porta-filtro da parte
inferior;
- b) com auxílio de uma esponja embebida em solução de de
tergente a 0,1%, lavar as superfícies interna e exter
na do equipamento;
- c) enxaguar em água corrente para eliminar todo o resíduo
de detergente;

- d) efetuar um enxágüe final com água destilada ou desionizada e escorrer bem a água;
- e) deixar secar à temperatura ambiente.

5.3.11.3 Preparo

- a) acoplar a parte superior do porta-filtro à parte inferior;
- b) embrulhar em papel Kraft.

5.3.11.4 Esterilização

Esterilizar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos.

Nota: Os porta-filtros podem ser esterilizados também por exposição a radiação ultra-violeta (ver anexo B-4).

5.3.12 Porta-filtros de aço inoxidável de 142 mm e 293 mm

5.3.12.1 Descontaminação

Descontaminar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos.

5.3.12.2 Lavagem e secagem

- a) desconectar a parte superior do porta-filtro da parte inferior;
- b) com auxílio de uma esponja embebida em solução de detergente a 0,1%, lavar as superfícies interna e externa dos porta-filtros;
- c) enxagüar em água corrente para eliminar todo o resíduo de detergente;
- d) enxagüar uma vez com água destilada;
- e) secar com jato de ar.

5.3.12.3 Preparo

- a) acoplar a parte superior do porta-filtro à parte inferior;
- b) rosquear levemente as borboletas de aperto e manter a válvula de purga aberta;
- c) guarnecer, com folha de papel alumínio, a válvula de purga e a entrada e a saída da água.

5.3.12.4 Esterilização

- a) esterilizar em autoclave a 121°C, durante 15 minutos;
- b) imediatamente após a esterilização, fechar as válvulas de purga.

5.3.13 Vasilhames de pressão de aço inoxidável

5.3.13.1 Descontaminação

Descontaminar em autoclave a 121°C, durante 30 minutos.

5.3.13.2 Lavagem

- a) lavar com auxílio de uma esponja embebida em solução de detergente a 0,1%;
- b) enxaguar em água corrente para eliminar todo o resíduo de detergente;
- c) efetuar um enxágue final com água destilada;
- d) colocar o equipamento em posição invertida e deixar à temperatura ambiente, para secagem.

5.3.13.3 Preparo

- a) mantendo a tampa apenas acoplada ao bocal do vasilhame (para permitir a penetração do vapor durante a esterilização), guarnecer o bocal com papel alumínio;
- b) guarnecer todas as aberturas do vasilhame com papel alumínio.

5.3.13.4 Esterilização

- a) esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos;
- b) imediatamente após a esterilização, fechar completamente a tampa.

5.3.14 Seringas automáticas tipo Cornwall, usadas para distribuição de meios de cultura

5.3.14.1 Lavagem

- a) após o uso, encher e esvaziar a seringa de 15 a 20 vezes com água destilada, para eliminar resíduos aderidos à sua parede e ao tubo de latex;
- b) desmontar a seringa cuidadosamente, tomando o cuidado para não perder nenhum componente;
- c) colocar todos os componentes em um recipiente contendo água destilada e ferver durante 15 minutos.

5.3.14.2 Preparo

- a) após a fervura, montar cuidadosamente a seringa, obedecendo aos cuidados de assepsia;
- b) deixar secar à temperatura ambiente ou em estufa em temperatura adequada.

5.3.14.3 Esterilização

Se for requerida a esterilização, embrulhar em papel Kraft e esterilizar em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

ANEXO A - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARESA-1 Pré-tratamento para eliminação de fenol e substâncias tóxicas em tampas plásticas e vedações de borracha novas

Vedações de borracha e tampas plásticas novas podem conter resíduos tóxicos provenientes dos componentes utilizados em sua fabricação e que se não forem removidos antes de sua utilização em laboratórios de microbiologia, poderão alterar a composição de soluções e meios de cultura. Em decorrência disto, é requerido um pré-tratamento das mesmas, antes de sua utilização no laboratório.

A-1.1 Processo simplificado

- a) imergir as tampas ou as vedações de borracha em água destilada contida em recipiente adequado (béquer, etc.);
- b) autoclavar a 121°C, durante 30 minutos;
- c) repetir essa operação 6 vezes consecutivas (ou mais, se necessário), efetuando a troca de água destilada a cada autoclavação;

Nota: Para comprovação da eliminação dos resíduos tóxicos, realizar prova de adequabilidade biológica (ver Norma CETESB L5.215) e determinação de fenol da água destilada proveniente da última autoclavação.

Nota: As tampas e vedações só estarão em condições de uso quando a prova de adequabilidade apresentar resultados da razão B/A compreendidos num intervalo de 0,8 a 3,0, e a análise de fenol apresentar resultado negativo.

A-1.2 Processo alternativo

- a) imergir as tampas e vedações de borracha em solução de hidróxido de sódio 3N contida em recipiente adequado e deixar em contato durante 24 horas;
- b) remover a solução de hidróxido de sódio após esse período;
- c) neutralizar com solução de ácido clorídrico 1N;
- d) após a neutralização, remover as tampas e colocar em béquer contendo água destilada;
- e) proceder como descrito em A-1.1 (processo simplificado).

A-2 Pré-tratamento de vidraria nova, para eliminação de gordura e outros resíduos

- a) Imergir a vidraria em solução de ácido clorídrico a 1%, contida em recipiente adequado;

- b) deixar em repouso durante 12 horas;
- c) retirar a vidraria da solução de ácido clorídrico e enxaguar cuidadosamente em água corrente;
- d) imergir a vidraria em solução de detergente em concentração adequada e proceder a sua lavagem normal, conforme descrito em 5.3.1 a 5.3.8.

Nota: Este tratamento é recomendado também em casos em que o procedimento usual de lavagem não é suficiente para a remoção completa de resíduos da vidraria já em uso no laboratório.

A-3 Tratamento de rolhas de borracha para eliminação de elementos tóxicos

- a) Imergir as rolhas novas em solução de hidróxido de sódio a 0,4%;
- b) ferver durante 30 minutos;
- c) enxaguar em água corrente, durante 15 minutos;
- d) ferver em solução de ácido clorídrico a 0,4% durante 30 minutos;
- e) enxaguar em água corrente durante 1 hora;
- f) ferver em solução de bicarbonato de sódio a 4% durante 30 minutos;
- g) enxaguar em água corrente durante 1 hora;
- h) enxaguar 1 vez em água destilada ou desionizada.

A-4 Procedimento para verificação de alcalinidade em vidraria nova

Toda a vidraria a ser utilizada em laboratório de microbiologia deve ser de vidro neutro de boa qualidade. Vidros alcalinos não podem ser utilizados, pois a liberação de resíduos alcalinos na água ou nos meios de cultura podem determinar alteração na composição de meios de cultura e nos valores de pH.

A comprovação da não liberação de resíduos alcalinos pela vidraria é realizada da seguinte maneira:

- a) encher com água destilada a vidraria a ser testada;
- b) autoclavar a 121°C, durante 15 minutos;
- c) após o resfriamento, adicionar algumas gotas de solução alcoólica de fenolftaleína à água destilada contida na vidraria em teste;
- d) após a adição da solução de fenolftaleína, a água destilada deverá continuar incolor. Se houver mudança de incolor para rosa, isto indica que o vidro é alcalino e não deve ser utilizado.

A-5 Procedimento para reutilização de membranas filtrantes

Em situações esporádicas, pode-se proceder à reutilização de membranas filtrantes após seu uso em análises microbiológicas, como medida alternativa de emergência, desde que não se tenha verificado crescimento de microrganismos em sua superfície e que sua reutilização seja feita para análises com o mesmo meio de cultura empregado na análise anterior.

O processo de recuperação pode ser efetuado de duas maneiras:

A-5.1 Procedimento simplificado

- a) com uma pinça de extremidades arredondadas, retirar a membrana da superfície do meio de cultura contido na placa, tomando o devido cuidado para não danificá-la;
- b) colocar as membranas em um béquer contendo água destilada;
- c) ferver durante 15 minutos;
- d) trocar a água destilada, e realizar mais duas fervuras de 15 minutos, sempre trocando a água destilada entre uma fervura e outra;
- e) após as 3 fervuras, remover as membranas danificadas e descartá-las;
- f) colocar as restantes sobre papel de filtro, para secagem, em local limpo e livre de poeira;
- g) após a secagem, agrupar as membranas, separando uma da outra com papel de filtro grosso;
- h) embrulhar cada conjunto de 10 membranas em papel Kraft;
- i) esterilizar em autoclave a 121°C durante 10 minutos (ver Anexo A-6).

A-5.2 Procedimento alternativo

- a) com uma pinça de extremidades arredondadas, retirar a membrana da superfície do meio de cultura contido na placa, tomando cuidado para não danificá-la;
- b) colocar as membranas em um béquer contendo água destilada;
- c) ferver durante 15 minutos;
- d) trocar a água e repetir o processo de fervura por mais duas vezes;
- e) remover as membranas danificadas;
- f) imergir as membranas em solução de sulfito de sódio a 10%. Deixar em repouso durante 30 minutos;
- g) retirar as membranas da solução de sulfito de sódio a 10%;
- h) colocar em béquer contendo solução de ácido clorídrico a 3%;

- i) ferver a solução durante 10 minutos;
- j) após a fervura, retirar as membranas da solução;
- l) ferver as membranas em água destilada por 2 vezes, durante 15 minutos, trocando a água após cada fervura;
- m) após a última fervura, adicionar à água destilada, no recipiente que contém as membranas, uma pequena quantidade de bicarbonato de sódio (± 1 g) e do corante púrpura de bromocresol (± 1 g);
- n) ferver durante 5 minutos;
- o) após a fervura, a água ficará levemente amarela (indicação de solução com pH ácido);
- p) acrescentar aos poucos à solução uma quantidade adequada de bicarbonato de sódio, até que a água atinja a tonalidade de azul clara (indicação de solução com pH neutro);
- q) transferir as membranas para um béquer contendo água destilada, para um último enxágüe;
- r) retirá-las da água destilada, e descartar as membranas danificadas;
- s) dispor as restantes sobre folha de papel de filtro, para secagem, em local limpo e livre de poeira;
- t) na seqüência à secagem, proceder conforme descrito em A-5.1.

A-6 Procedimentos para esterilização de membranas filtrantes

A esterilização de membranas filtrantes é essencial em todas as aplicações envolvendo filtração de líquidos para a remoção de bactérias e para uso na quantificação de bactérias pela técnica de membrana filtrante.

Usualmente, as membranas filtrantes são embaladas individualmente, ou acondicionadas em envelopes fechados contendo 10 (dez) unidades, sendo pré-esterilizadas pelo fabricante, estando, portanto, prontas para uso. Quando isto não ocorre, a esterilização deve ser feita através de autoclavação a 121°C, durante 10 (dez) minutos; imediatamente após esse período de tempo, deve-se efetuar a exaustão do vapor da autoclave e as membranas devem ser prontamente removidas para minimizar sua exposição ao calor. A exposição excessiva das membranas filtrantes às temperaturas de esterilização pode determinar o fechamento dos poros, disto decorrendo não uniformidade na velocidade de filtração em toda área da membrana; além disso, as membranas podem se tornar mais frágeis e quebradiças.

Comercialmente, a pré-esterilização das membranas filtrantes pode

ser feita através da autoclavação, radiação gama ou exposição a óxido de etileno. Um estudo comparativo, relativo à avaliação de membranas filtrantes pré-esterilizadas, demonstrou haver um aumento significativo na taxa de recuperação bacteriana em membranas esterilizadas por autoclavação, em relação a membranas esterilizadas por exposição a óxido de etileno, sugerindo a presença de resíduos tóxicos nas membranas esterilizadas por esse último método. Neste sentido, para laboratórios que estão utilizando membranas filtrantes pré-esterilizadas por óxido de etileno, é aconselhável que alguns pacotes de membrana do lote em uso sejam autoclavadas no laboratório para uma posterior comparação com as membranas pré-esterilizadas por óxido de etileno, através da aplicação de teste de recuperação bacteriana, utilizando culturas puras de bactérias. Este teste irá evidenciar se resíduos tóxicos ainda estão presentes nas membranas pré-esterilizadas por óxido de etileno e, se isto ocorrer, é recomendável que todo lote seja submetido a uma autoclavação a 121°C durante 10 (dez) minutos, antes de sua utilização no laboratório.

ANEXO B - RECOMENDAÇÕES DE ORDEM GERALB-1 Controle da qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada em laboratórios de microbiologia, 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).

B-2 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos de Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-as no centro da caixa contendo os meios de cultura a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria a 55°C, durante 24-48 horas. Se houver mudança de coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

B-3 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 destes teste, ver Norma CETESB L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água.

B-4 Controle da eficiência de lâmpadas germicidas ultra-violeta

Essas lâmpadas emitem radiações ultra-violeta com ação germicida. A luz ultra-violeta inclui radiações entre 150 a 4.000 Angstrons (Å), mas radiações inferiores a 1.800 Å são absorvidas pelo oxigênio atmosférico, não tendo, portanto, aplicação para esterilização. O efeito mais potente para a morte de microrganismos ocorre a 2 600 Å. As lâmpadas germicidas comerciais emitem primariamente 2 537 Å, que tem 85% da capacidade germicida das radiações de 2 600 Å.

B-4.1 Avaliação da eficiência na esterilização

Embora a vida média de uma lâmpada U.V. possa ser de 5 000 horas, na prática esse tempo depende primariamente das características individuais das lâmpadas e do número de vezes em que a mesma é utilizada. Assim o simples controle do número de horas de operação e sua comparação com o tempo-limite recomendado pelo fabricante é de valor questionável como único controle na avaliação da eficiência das

lâmpadas germicidas no processo de esterilização. Para um controle efetivo, as lâmpadas devem ser testadas quinzenalmente, com um medidor de luz U.V. (luxímetro) e substituídas se estiverem emitindo menos de 80% de sua capacidade inicial. É recomendada também, para essa avaliação, a realização de teste bacteriológico específico, sendo a seguinte a sequência de procedimento para sua execução:

- a) preparar "Plate Count Agar" em quantidade adequada para o número de placas necessárias para o teste e distribuir volumes de 10 a 15 mL do meio fundido em placas de Petri de 15 mm x 150 mm. Manter essas placas ligeiramente abertas em ambiente asséptico, até que o meio se solidifique e a água de condensação evapore;
- b) fechar as placas e mantê-las em refrigerador até o momento do uso: (Obs.: ver Norma CETESB L5.201, para informações quanto à composição e preparo de "Plate Count Agar");
- c) preparar uma série de diluições de uma cultura de uma bactéria do grupo coliforme, de modo a obter uma diluição tal que um inóculo de 0,5 mL da mesma forneça contagem de 200 a 250 microrganismos. (Obs.: ver Norma CETESB L5.215 para informações quanto ao preparo da suspensão bacteriana e diluições da mesma);
- d) para a realização do teste, pipetar 0,5 mL da diluição selecionada (contagens de 200 a 250 microrganismos) na superfície do "Plate Count Agar" contido em placas preparadas segundo especificado no item B-1;
- e) a seguir, com todos os cuidados de assepsia, efetuar o espalhamento do inóculo sobre a superfície do "Plate Count Agar". Para isso, proceder da seguinte maneira:
 - colocar uma alça de Drigalski em um recipiente com álcool etílico. Removê-la e passar por uma chama;
 - após todo álcool ter sido queimado, deixar esfriar durante 15 segundos e, antes de efetuar o espalhamento, testar se a temperatura da alça é segura para uso, tocando com a mesma o "Plate Count Agar", nas bordas da placa de Petri em que o mesmo está contido;
 - após essa verificação, efetuar o espalhamento, posicionando a alça de Drigalski perpendicularmente à superfície do agar, no ponto em que o inóculo foi depositado. Mantendo a placa parada, efetuar movimentos circulares com a alça, até o completo espalhamento do inóculo sobre toda a superfície do meio de cultura;
 - após ter sido usada, colocar a alça de Drigalski em solução desinfetante;

- após o espalhamento, colocar cada placa inoculada sob a luz ultra-violeta, nos pontos em que se deseja verificar sua eficiência na esterilização, mantendo as placas abertas durante dois minutos. Como controle, separar uma das placas inoculadas, mantendo-a aberta sob a luz comum do laboratório, durante o meso período de tempo.
- fechar as placas e incubá-las a 35°C durante 24 horas;
- após esse período de incubação, efetuar a contagem em todas as placas.

A placa-controle deve conter 200-250 colônias e, nas placas irradiadas por luz ultra-violeta, é esperada uma redução mínima de 99% em relação à contagem obtida na placa-controle. Se essa redução for inferior a 80%, a lâmpada ultra-violeta em teste deve ser substituída.

B-5 Escolha do detergente

A seleção do detergente e a definição da concentração do mesmo a ser utilizada na lavagem de vidraria constituem itens básicos em laboratórios de microbiologia. Nesse sentido, é requerida a realização de um teste prévio para avaliar a adequação do detergente selecionado e verificar se o procedimento de enxágue é suficiente para a remoção dos resíduos do detergente (ver Norma CETESB L5.011). Detergentes como Extran alcalino, Teepol e Odd, usados na concentração de 0,1%, sendo a lavagem seguida de um mínimo de 10 enxágues, tem apresentado resultados satisfatórios.

B-6 Preparo de frascos para colheita de amostras

O preparo desses frascos requer a adição prévia de agentes adequados, em função do tipo de amostra a ser colhida.

B-6.1 Agente neutralizador de cloro residual

Para a colheita de amostras de águas tratadas, deve-se adicionar ao frasco de colheita, antes de sua esterilização, 0,1 mL de uma solução a 1,8% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, para neutralizar a ação do cloro residual. Essa quantidade de tiosulfato de sódio é suficiente para neutralizar concentrações de até 5 mg/L de cloro residual, sendo adequada para as amostras de rotina. Em situações especiais, como por exemplo em emergências, em que o residual de cloro pode ser maior, uma maior quantidade de tiosulfato é requerida. Nestes casos, podem ser utilizados volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% de tiosulfato de sódio para cada 100 mL da amostra, sendo esta quantidade suficiente para neutralizar concentrações de até 15 mg/L de cloro residual.

B-6.2 Agentes quelantes

Para a colheita de amostra de águas poluídas, suspeitas de conterem concentrações superiores a 0,01 mg/L de metais pesados, tais como cobre, zinco, etc., deve-se adicionar ao frasco de colheita, antes de sua esterilização, 0,3 mL de uma solução a 15% de EDTA, para cada 100 mL da amostra, além do tiosulfato de sódio (volumes de 0,1 mL de uma solução a 10% para cada 100 mL da amostra). A solução de EDTA pode ser adicionada ao frasco da colheita separadamente ou já combinada com a solução de tiosulfato de sódio antes da adição. O EDTA atua como agente quelante, reduzindo a ação tóxica de metais, apresetnando uma ação mais ampla que o tiosulfato de sódio, o qual, na concentração empregada, previne apenas a ação bactericida do cobre.

/ANEXO C

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Microbiological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16 ed., Washington, APWA, AWWA, WPCF, 1985, p. 827-1038.
- C-2 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Korczynski, M.S. Sterilization In: Manual of Methods for General Bacteriology. Washington, 1981. chapter 23, p. 476-486.
- C-3 BARRY, A.L. & BERNSOHN, K.L. The role of quality control in the clinical bacteriology laboratory, Amer.J.Med.Tech., 34:195-201, 1968.
- C-4 BIER, O. Bacteriologia e Imunologia, 19 ed. São Paulo, Edições Melhoramentos. 1978.
- C-5 BORDNER, R. & WINTER, J. ed. Microbiological methods for monitoring the environment: water and wastes. U.S. Environmental Protection Agency, 1978. 338 p. (EPA-600/8-78-017).
- C-6 CETESB. Guia para avaliação de laboratórios bacteriológicos de análises de água. São Paulo, 1978. 81 p.
- C-7 _____. Guia de orientação para coleta e preservação de amostras. São Paulo, 1982. 201 p.
- C-8 _____. Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água. São Paulo, 1978 (NT. L5.010).
- C-9 _____. Contagem de bactérias heterotróficas, 1ª revisão: São Paulo, 1986 (NT. L5.201).
- C-10 _____. Controle de qualidade de meios de cultura. São Paulo, 1979. (NT. L5.216).
- C-11 _____. Determinação de coliformes totais através da técnica de membrana filtrante, 1ª revisão. São Paulo, 1984 (NT. L5.214).

- C-12 .Lavagem, preparo e esterilização de materiais em labora-
tórios de microbiologia. São Paulo, 1978 (NT. M1.001).
- C-13 . Prova de adequabilidade biológica da água destilada pa-
ra fins microbiológicos, 1ª. revisão São Paulo, 1985 (NT.L5.215)
- C-14 DAVIS, D.B.; DULBECCO, R. Sterilization and disinfec^otion. In:
Microbiology. 3rd, ed Pennsylvania, Harper & Row, 1980. Chap-
ter 67. p. 1263-1274.
- C-15 DUTKA, B.J.; JACKSON, M.J. & BELL, J.B. Comparison of autocla-
ve and ethylene-oxide-sterilized membrane filters used in
water quality studies. Applied Microbiology, 28(3): 474-480,
1974.
- C-16 GELDREICH, E.E. Handbook for evaluating water bacteriological
laboratories. 2 ed. U.S. Environmental Protection Agency ,
1975. 195 p. (EPA-670/9-75-006).
- C-17 KELSEY, J.C. The testing of sterilizers. J.Clin.Path., 14:313-
319, 1961.
- C-18 MINKIN, J.L. & KELLERMAN, A.S. A bacteriological method of
estimating effectiveness of UV germicidal lamps. Public
Health Reports, 81: 875-884, 1966..
- C-19 STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M. & ADELBERG, E.A. Mundo dos micró-
bios (tradução Elfried Kirchner), Editora Edgard Blucher
Ltda., 1969.
- C-20 SYKES, G. Disinfection and sterilization, 2 ed., London, E. &
F.N. Spon Ltda., 1965.
-