



CETESB

## NORMA TÉCNICA

**P2.112**

1ª Edição  
Novembro 2016  
18 páginas

**Sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos de serviços de saúde contaminados biologicamente: teste de inativação microbiana utilizando esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus* como bioindicadores**

***Title in English:***

*Non-incineration treatment systems for biologically contaminated medical waste: microbial inactivation test using Bacillus atrophaeus and Geobacillus stearothermophilus spores as bioindicators*

**Resumo**

Estabelece os procedimentos para a realização do teste de inativação microbiana em sistemas de tratamento térmico sem combustão para desinfecção de resíduos de serviços de saúde contaminados biologicamente, utilizando como bioindicadores esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus*. O teste de inativação microbiana em sistemas de tratamento térmico sem combustão é necessário para as condições previstas na norma técnica CETESB E15.010/2011.

**Palavras chave**

Teste de inativação microbiana  
Resíduos de serviços de saúde  
Tratamento térmico sem combustão  
*Bacillus atrophaeus*  
*Geobacillus stearothermophilus*

**Key words**

Microbial inactivation test  
Medical waste  
Non-incineration treatment  
*Bacillus atrophaeus*  
*Geobacillus stearothermophilus*

**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>

## Primeira Edição

Novembro/2016, homologada pela Decisão de Diretoria–DD Nº 285/2016/E, de 20/12/2016

© CETESB 2016

É permitida a reprodução total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte. Direitos reservados de distribuição.

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	2
<b>2</b>	<b>Objetivo</b> .....	2
<b>3</b>	<b>Abrangência</b> .....	3
<b>4</b>	<b>Documentos complementares</b> .....	3
<b>5</b>	<b>Definições</b> .....	3
<b>6</b>	<b>Equipamentos</b> .....	4
<b>7</b>	<b>Materiais</b> .....	6
<b>8</b>	<b>Meios de cultura e solução</b> .....	9
<b>9</b>	<b>Bioindicadores</b> .....	11
<b>10</b>	<b>Preparo do material com bioindicadores</b> .....	12
<b>11</b>	<b>Execução do ensaio</b> .....	13
<b>12</b>	<b>Resultados</b> .....	15
<b>13</b>	<b>Relatórios de ensaio</b> .....	15
	<b>Referências</b> .....	17
	<b>Anexo A – Fluxograma</b> .....	18

## 1 Introdução

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), órgão de controle ambiental do Estado de São Paulo, por meio da Norma CETESB E.15.010 (CETESB, 2011), fixa as condições exigíveis para a aceitação da operação de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos de serviços de saúde contaminados biologicamente. O tratamento de desinfecção deve promover uma inativação microbiana mínima de nível III, comprovada por teste de eficiência, utilizando bioindicadores. Nesta norma, são empregados como bioindicadores esporos das bactérias *Bacillus atropheus* (FRITZE; PUKALL, 2001) para teste em sistemas de tratamento que utilizam calor seco e esporos de *Geobacillus stearothermophilus* (NAZINA et al., 2001) para calor úmido.

## 2 Objetivo

Esta norma tem por objetivo estabelecer os procedimentos analíticos necessários para a realização do teste de inativação microbiana, com o emprego de fitas impregnadas com esporos dos bioindicadores *B. atropheus* ou *G. stearothermophilus*, utilizado na avaliação da eficiência de sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos

contaminados biologicamente.

### 3 Abrangência

Os procedimentos estabelecidos nesta norma devem ser utilizados pelos laboratórios de instituições públicas ou privadas que realizem o teste de inativação microbiana em sistemas de tratamento térmico sem combustão para desinfecção de resíduos de serviços de saúde contaminados biologicamente, conforme as condições previstas na norma técnica CETESB E15.010/2011 (CETESB, 2011).

### 4 Documentos complementares

Os documentos relacionados a seguir contêm disposições que constituem fundamento para este procedimento. As edições indicadas estavam em vigor no momento desta publicação. Como toda norma está sujeita a revisões e alterações, aqueles que realizam procedimentos com base nesta, devem verificar a existência de legislação superveniente aplicável ou de edições mais recentes das normas citadas.

Na aplicação desta norma, devem ser consultados os seguintes documentos:

- APHA; AWWA; WEF. Quality assurance/quality control. In: \_\_\_\_\_. **Standard methods for the examination of water and wastewater**: online. Washington, DC, c2016. Part 9020. Approved by Standard Methods Committee, 2005. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org/store>>. Acesso em: nov. 2016.
- CETESB. **Norma técnica E15.010**: sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos de serviços de saúde contaminados biologicamente: procedimento. 2.ed.rev. São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/normas-tecnicas-cetesb/normas-tecnicas-vigentes/>>. Acesso em: nov. 2016.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Resolução SMA nº 100, de 17-10-2013. Regulamenta as exigências para os resultados analíticos, incluindo-se a amostragem, objeto de apreciação pelos órgãos integrantes do Sistema Estadual de Administração da Qualidade Ambiental, Proteção, Controle e Desenvolvimento do Meio Ambiente e Uso Adequado dos Recursos Naturais – SEAQUA. Diário Oficial [do] Estado de São Paulo, Poder Executivo, São Paulo, v. 123, n. 200, 22 out. 2013. Seção 1, p. 41. Disponível em: <[https://www.imprensaoficial.com.br/Certificacao/Certificador.aspx?caderno=Executivo%20I&link=/2013/executivo%20secao%20i/outubro/22/pag\\_0041\\_ATL027P7OQ3AAe5GV9GTHSPKQMI.pdf](https://www.imprensaoficial.com.br/Certificacao/Certificador.aspx?caderno=Executivo%20I&link=/2013/executivo%20secao%20i/outubro/22/pag_0041_ATL027P7OQ3AAe5GV9GTHSPKQMI.pdf)>. Acesso em: nov. 2016.
- USEPA. **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water**: criteria and procedures quality assurance. 5<sup>th</sup> ed. Cincinnati, OH, 2005. 209 p. (EPA 815-R-05-004). Disponível em: <<https://www.epa.gov/dwlabcert/laboratory-certification-manual-drinking-water>>. Acesso em: nov. 2016.

### 5 Definições

Para os efeitos desta norma, são adotadas as definições de 5.1 a 5.6:

#### 5.1 Bioindicador

Organismo utilizado como agente biológico representativo para verificar a eficiência do processo de tratamento de resíduos.

## 5.2 Esporo

Célula de repouso formada por certos micro-organismos quando se encontram em condições ambientais desfavoráveis, que apresenta como característica alta resistência a agentes físicos e químicos. Esta propriedade de resistência possibilita sua escolha como indicador biológico.

## 5.3 Desinfecção

Procedimento que reduz o nível de contaminação microbiana. No âmbito desta norma, a desinfecção deve atingir uma inativação microbiana de nível III, conforme definido no **item 5.4**.

## 5.4 Inativação microbiana de nível III

Inativação de formas vegetativas de bactérias, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias, com redução igual ou superior a  $6 \log_{10}$ ; e inativação de esporos de *Bacillus atropheus* e *Geobacillus stearothermophilus* com uma redução igual ou superior a  $4 \log_{10}$  (EPRI, 1988).

## 5.5 Valor de D (valor de redução decimal)

O valor de D (*D-value*) de um bioindicador é o valor, em tempo ou dose, necessário para reduzir a viabilidade da população de micro-organismos em 1 log ou 90%, em determinadas condições. Por exemplo, para a redução de 90% de um bioindicador submetido a desinfecção por calor úmido a 121°C são necessários 2,5 minutos, sendo que o valor de D é dado por  $D_{121^{\circ}\text{C}} = 2,5$  minutos.

## 5.6 Resíduo contaminado biologicamente

Resíduo de serviços de saúde que, por suas características de maior virulência, infectividade e concentração de patógenos, apresenta risco potencial adicional à saúde pública.

# 6 Equipamentos

Para execução dos procedimentos analíticos descritos nesta norma, são empregados os equipamentos listados a seguir.

## 6.1 Incubadora microbiológica a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Deve manter a temperatura na faixa requerida. O termômetro digital utilizado para o controle da incubadora deve ter resolução igual ou menor que  $0,5^{\circ}\text{C}$  e estar imerso em líquido.

## 6.2 Incubadora microbiológica a $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Deve manter a temperatura na faixa requerida. O termômetro digital utilizado para o controle da incubadora deve ter resolução igual ou menor que  $0,5^{\circ}\text{C}$  e estar imerso em líquido.

### 6.3 Cabine de segurança biológica

Deve ser equipada com filtros HEPA, cuja eficiência de filtragem é de 99,995% para partículas iguais ou maiores que 0,3 µm. O ar estéril produzido deve ser dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho, para proporcionar segurança nos manuseios que devem ser realizados em condições de esterilidade, como também proteção aos operadores.

### 6.4 Autoclave

Deve ter capacidade suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado. Deve manter a temperatura de esterilização de 121°C durante o ciclo, o qual não deve exceder 45 minutos para um tempo de esterilização de 15 minutos.

As autoclaves mais modernas que possuem portas deslizantes, com abertura e fechamento automáticos, ciclos programáveis de esterilização e monitoramento contínuo de temperatura e pressão, também podem apresentar etapas de resfriamento e remoção do vapor como parte do ciclo; para esses equipamentos, não é requerido o tempo estrito de 45 minutos para o ciclo, desde que os registros impressos indiquem a operação do ciclo normal e o resfriamento durante a exaustão e remoção do vapor.

Deve ser submetida semanalmente a teste para avaliar sua eficiência na inativação de  $1 \times 10^6$  de esporos de *Geobacillus stearothermophilus*.

### 6.5 Medidor de pH

Deve fornecer exatidão mínima de 0,1 unidade de pH. Sua verificação deve ser feita antes de cada período de uso com duas soluções-tampão padrões (Exemplo: pH = 6,86 e pH = 4,0 ou pH = 9,18), de acordo com o pH do meio de cultura ou solução que estiver sendo preparada.

### 6.6 Balança de topo

É utilizada para pesar quantidades superiores ou iguais a 2 g. Deve ter sensibilidade de, no mínimo, 0,1 g ao serem pesados 150 g.

**Importante:** Os equipamentos listados acima devem ser submetidos a calibrações e manutenções preventivas periódicas realizadas por laboratórios pertencentes à Rede Brasileira de Calibração (RBC).

### 6.7 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água que obedeça aos critérios de qualidade estabelecidos no Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (AWWA; APHA; WEF, c2016).

### 6.8 Refrigerador a $5 \pm 3^\circ\text{C}$

Deve manter a temperatura na faixa requerida e ter capacidade para armazenar meios de cultura, reagentes ou soluções que necessitam de refrigeração. O termômetro digital utilizado para controle de temperatura deve ter resolução igual ou menor que 1°C e estar imerso em líquido.

### 6.9 Banho-maria a 50-55°C

Equipado com termostato para manter a temperatura uniforme em todos os pontos, com capacidade suficiente para comportar recipientes contendo o meio de cultura, o qual após

fusão prévia, deve ter sua temperatura estabilizada nessa faixa no momento do uso. O termômetro digital utilizado para controle de temperatura deve ter resolução igual ou menor que 1°C.

#### 6.10 Chapa aquecedora

Com temperatura regulável.

#### 6.11 Estufa (forno) para esterilização

Deve manter uma temperatura de esterilização estável, de 170 a 180°C, durante o período de esterilização de 2 horas. O termômetro deve ter a escala graduada, em incrementos de 10°C ou menos, com seu bulbo colocado em areia, durante o uso. É utilizada para esterilização de vidrarias.

## 7 Materiais

Para execução dos procedimentos analíticos descritos nesta norma, são empregados os materiais listados a seguir.

#### 7.1 Erlenmeyer

Deve ser de vidro borossilicato, vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico e com capacidade adequada para o preparo dos meios de cultura e soluções.

#### 7.2 Béquer

Deve ser de vidro borossilicato, vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico e com capacidade adequada para o preparo das soluções.

#### 7.3 Balão volumétrico

Deve ser de vidro borossilicato, vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico e com capacidade adequada para o preparo das soluções.

#### 7.4 Provetas

Devem ser de vidro borossilicato, vidro neutro ou plástico autoclavável atóxico, graduadas e com capacidade para volumes de 500 mL e 1000 mL.

#### 7.5 Tubos de ensaio

Com capacidade adequada para conter 12 a 15 mL do meio de cultura (usualmente são empregados tubos de ensaio de 16 x 150 mm).

#### 7.6 Frasco âmbar com tampa rosqueável

Deve ser de vidro borossilicato ou vidro neutro e com capacidade adequada para o armazenamento da solução de NaOH.

#### 7.7 Placas de Petri

Devem ser de vidro borossilicato ou vidro neutro, com 100 mm de diâmetro e 15 mm de altura ou de plástico atóxico, com 90 mm de diâmetro e 15 mm de altura.

**Importante:** Todas as vidrarias e materiais plásticos devem estar estéreis.

#### 7.8 Tubos cônicos de polipropileno

Devem ser descartáveis, resistentes à autoclavagem, com tampa de rosca e em tamanho suficiente para acomodação das fitas de bioindicadores. Recomenda-se a utilização de tubos com capacidade para 15 ou 50 mL. Devem conter pequenos orifícios no corpo do tubo que permitam a entrada de vapor. Podem ser reutilizados, desde que sejam esterilizados por autoclavagem a 121°C por no mínimo 60 minutos. Antes do uso, embalar em papel grau cirúrgico e autoclavar a 121°C por no mínimo 30 minutos.

Podem ser substituídos por recipiente perfurado de metal ou outro material resistente à autoclavagem.

#### 7.9 Sacos de tecido

Devem ser confeccionados em tecido permeável ao calor e à umidade e em dimensões adequadas para colocação dos tubos e/ou fitas de bioindicadores. Recomenda-se a utilização de tecido grosso de algodão do tipo chenille. Podem ser reutilizados, desde que sejam esterilizados por autoclavagem a 121°C por no mínimo 60 minutos. Antes do uso, embalar em papel grau cirúrgico e autoclavar a 121°C por no mínimo 30 minutos.

#### 7.10 Estantes para tubos

Deve apresentar tamanho adequado para colocação dos tubos de ensaio e tubos cônicos.

#### 7.11 Saco plástico autoclavável

Deve ser fabricado em polietileno de alta densidade e ser resistente à autoclavagem a 121°C.

#### 7.12 Pinça

Deve ser de aço inoxidável, com as extremidades arredondadas. Antes do uso, embalar em papel grau cirúrgico e autoclavar a 121°C por no mínimo 30 minutos.

#### 7.13 Tesoura

Deve ser de aço inoxidável. Antes do uso, embalar em papel grau cirúrgico e autoclavar a 121°C por no mínimo 30 minutos.

#### 7.14 Caixas plásticas com tampa hermética

Devem apresentar tamanho adequado para incubação das placas de TSA.

#### 7.15 Alça de inoculação

Pode ser fabricada em fio de níquel-cromo, platina-irídio ou platina, com 0,5 mm de diâmetro e 50 a 80 mm de comprimento, fixado a um cabo metálico (cabo de Kolle).

#### 7.16 Álcool etílico 70°GL

É utilizado para limpeza de superfícies. Preferencialmente deve ser filtrado em membrana 0,22 µm.

#### 7.17 Ácido peracético 0,2-0,5%

Solução esporocida utilizada na limpeza de superfícies.

#### 7.18 Gaze

Deve ser estéril. É utilizada na limpeza de superfícies com solução desinfetante de álcool ou ácido peracético.

#### 7.19 Luvas de procedimento descartáveis

Devem ser fabricadas em látex ou nitrila.

#### 7.20 Avental descartável

Deve ser de manga longa e fabricado em polipropileno atóxico.

#### 7.21 Máscaras respiratórias

Devem ser impermeáveis a fluídos e capazes de atuar como barreira a micro-organismos transportados pelo ar. Recomenda-se o uso de respiradores tipo PFF2, preferencialmente com válvula de exalação.

#### 7.22 Óculos de segurança

Devem ser resistentes a impactos e com proteção lateral.

#### 7.23 Papel grau cirúrgico

Deve ser apropriado para esterilização de material por autoclavagem.

#### 7.24 Caixa isotérmica

Deve ser de polipropileno com revestimento interno de poliuretano e de tamanho adequado para colocação dos tubos, sacos de tecido e/ou bolsas de sangue contendo as fitas de bioindicadores.

#### 7.25 Termômetros

Os termômetros de vidro devem ter escala adequada ao uso (faixa de medição e graduação) e a coluna de líquido não deve apresentar interrupções. Os termômetros eletrônicos digitais devem apresentar faixa de medição, resolução, exatidão e precisão adequadas ao uso. Todos os termômetros devem ser calibrados periodicamente em laboratório pertencente à RBC e a correção da temperatura deve ser efetuada, quando aplicável.

#### 7.26 Bolsas para coleta de sangue

Devem ser estéreis e sem anticoagulante. Podem ser adquiridas em empresas especializadas em materiais hospitalares.

#### 7.27 Sangue bovino com anticoagulante

Pode ser adquirido em abatedouros.

#### 7.28 Cola para PVC flexível

Deve apresentar aderência e secagem em até 15 minutos.

#### 7.29 Seladora

Para uso em embalagens plásticas.

#### 7.30 Estilete

É utilizado na abertura das bolsas de sangue para colocação das fitas de bioindicadores.

Os materiais relacionados nas subalíneas 7.26 a 7.30 são empregados somente nos testes de eficiência em sistemas de tratamento para bolsas de sangue, nos quais os resíduos de saúde não são descaracterizados antes do processo de desinfecção.

## 8 Meios de cultura e solução

**Importante:** Os reagentes e meios de cultura devem ser adquiridos acompanhados de certificados de análise que comprovem sua qualidade quanto à composição e grau de pureza.

A seguir são descritas as fórmulas dos meios de cultura e soluções, bem como os modos de preparo, formas de armazenamento e prazos de validade.

### 8.1 Caldo triptona e soja com dextrose (TSB)

#### a) fórmula

- triptona .....	17,0 g
- peptona de soja.....	3,0 g
- dextrose .....	2,5 g
- cloreto de sódio (NaCl).....	5,0 g
- monohidrogeno-fosfato de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	2,5 g
- água destilada ou desionizada .....	1000 mL

pH final após esterilização: 7,3 ± 0,2

#### b) preparo

- pesar 30 g do meio desidratado e acrescentar 1000 mL de água destilada ou desionizada. Aquecer em agitação constante, tomando o cuidado para que não seja atingida a temperatura de ebulição. Se necessário, ajustar o pH com solução de hidróxido de sódio (NaOH 1N). Distribuir volumes de 10-15 mL em tubos de ensaio de 16 x 150 mm com tampa de rosca. Esterilizar por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos.

#### c) armazenamento

- temperatura ambiente (< 30°C)

#### d) validade

- 3 meses

## 8.2 Ágar triptona e soja (TSA)

### a) fórmula

- triptona.....	17,0 g
- peptona de soja.....	3,0 g
- dextrose .....	2,5 g
- cloreto de sódio (NaCl).....	5,0 g
- monohidrogeno-fosfato de potássio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	2,5 g
- ágar.....	15,0 g
- água destilada ou desionizada .....	1000 mL

pH final após esterilização: 7,3 ± 0,2

### b) preparo

- pesar 30 g do meio desidratado, acrescentar 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada ou desionizada. 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 com solução de hidróxido de sódio (NaOH 1N). Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após esterilização, estabilizar o meio a 50-55°C e distribuir volumes de 20 mL em placas de Petri.

### c) armazenamento

- refrigerador de 2 a 8°C.

### d) validade

- 15 dias.

**Importante:** Os meios de cultura devem ser rigorosamente submetidos a teste de esterilidade. Para tanto, separar uma quantidade representativa de 1 a 4% dos tubos ou placas de cada lote preparado e incubar a 35 ± 0,5°C por um período mínimo de 48 horas. Após esse período, observar a presença de crescimento microbiano. Utilizar somente lotes de meio de cultura com ausência de crescimento microbiano. Os lotes que apresentarem contaminação devem ser descartados.

## 8.3 Solução de hidróxido de sódio 1 N

### a) fórmula

- Hidróxido de sódio.....	40,0 g
- água destilada ou desionizada .....	1000 mL

### b) preparo

- pesar 40 g de hidróxido de sódio (NaOH) e colocar em um béquer de 1 L. Dissolver o NaOH em 500 mL de água destilada ou desionizada e transferir para um balão volumétrico. Completar o volume para 1000mL com água destilada ou desionizada. Colocar a solução em frasco âmbar com tampa rosqueável.

### c) armazenamento

- temperatura ambiente (< 30°C)

d) validade

- 6 meses

## 9 Bioindicadores

Para teste de inativação microbiana em sistemas de tratamento térmico sem combustão de acordo com os procedimentos descritos nesta norma, são empregados como indicadores esporos de *Bacillus atrophaeus* e *Geobacillus stearothermophilus*.

9.1 Fitas contendo  $10^4$  esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372

São empregadas nos testes de inativação microbiana em sistemas de tratamento que utilizam calor seco.

9.2 Fitas contendo  $10^4$  esporos de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 (**Fig. 1**)

São empregadas nos testes de inativação microbiana em sistemas de tratamento que utilizam calor úmido.

**Importante:** Os bioindicadores podem ser adquiridos comercialmente na forma de preparações contendo fitas de papel filtro impregnadas com os micro-organismos desejados e embaladas individualmente em papel impermeável; e devem ser acompanhados de certificado de análise que ateste a origem da cultura, contagem de esporos e valor de D.

**Figura 1 - Preparações comerciais contendo fitas de papel filtro impregnadas com  $10^4$  esporos de *Geobacillus stearothermophilus***



Fonte: CETESB (2015a)

## 10 Preparo do material com bioindicadores

Em condições de assepsia, preparar o material com bioindicadores na quantidade adequada, considerando o número e tamanho dos equipamentos a serem avaliados, como segue:

- a) numerar as embalagens contendo as fitas de bioindicadores;
- b) para testes em autoclaves, inserir uma unidade de fita em cada tubo cônico de polipropileno perfurado. Os tubos podem ser presos a cabos de metal (arame ou cabo de aço) para facilitar o posicionamento e a recuperação dos bioindicadores no equipamento em teste;
- c) para equipamentos de micro-ondas, com revolvimento dos resíduos de saúde durante o processo de desinfecção, recomenda-se inserir os tubos cônicos preparados em sacos de tecido numerados;
- d) para equipamentos de desativação eletrotérmica, inserir as fitas diretamente nos sacos de tecido;
- e) nos testes de desinfecção, nos quais se deseja avaliar a eficiência do tratamento na descontaminação de bolsas de sangue, as preparações comerciais de fitas contendo bioindicadores devem ser protegidas do contato direto com líquidos. Para tanto, preparar o material de acordo com seguintes procedimentos:
  - com auxílio de uma seladora, embalar individualmente as fitas em saco plástico autoclavável estéril;
  - com o auxílio de um estilete, fazer uma pequena abertura na lateral da bolsa de sangue (estéril e sem anticoagulante);
  - para cada bolsa de sangue, colocar uma fita de *B. atrophaeus* ou *G. stearothermophilus*;
  - preencher a bolsa de sangue com aproximadamente 400 mL de sangue bovino com anticoagulante;
  - selar o corte utilizando um retalho de uma bolsa de sangue e cola de PVC flexível.

### Importante:

- As condições de assepsia devem incluir a realização do procedimento em cabine de segurança biológica previamente submetida à descontaminação das superfícies com ácido peracético. Todo material a ser utilizado deve ser cuidadosamente desinfetado com ácido peracético antes de ser introduzido na cabine. A cada uso realizar teste de esterilidade da cabine utilizando placas de TSA.
- Durante os procedimentos analíticos, os técnicos responsáveis pela execução do ensaio devem utilizar luvas, touca, avental, máscara e óculos de proteção.

## 11 Execução do teste

Para execução do teste de inativação microbiana, seguir os procedimentos descritos:

- a) antes da saída para o local de teste do equipamento, uma fita controle de saída deverá ser assepticamente inoculada em um tubo contendo caldo triptona e soja (TSB). Para tanto, com auxílio de pinças estéreis, abrir cuidadosamente a embalagem da preparação comercial, retirar a fita e inocular no tubo de TSB;
- b) incubar os tubos a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  (*B. atrophaeus*) ou  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  (*G. stearothermophilus*) por até 7 dias;
- c) colocar os tubos, sacos de tecido e/ou bolsas de sangue contendo as fitas a serem testadas em caixa isotérmica e transportar até o local de instalação do equipamento a ser avaliado;
- d) um tubo, saco de tecido e/ou bolsa de sangue contendo a fita controle deve permanecer a temperatura ambiente durante toda a realização do teste;
- e) os demais tubos, sacos de tecido e/ou bolsas de sangue devem ser submetidos ao processo de tratamento durante uma operação de rotina do equipamento;
- f) após a finalização da operação do equipamento, os tubos, sacos de tecido e/ou bolsas de sangue contendo as fitas tratadas devem ser imediatamente colocados em sacos plásticos estéreis e levados ao laboratório em caixa isotérmica, juntamente com o tubo, saco de tecido e/ou bolsa de sangue contendo a fita controle;
- g) um funcionário do laboratório deverá acompanhar todo o procedimento, desde a preparação do material, transporte, colocação e retirada das fitas no equipamento, manutenção da fita controle à temperatura ambiente, até o retorno das fitas ao laboratório;

### Importante:

- O ensaio laboratorial deve ser iniciado em um prazo máximo de 8 horas após a retirada das fitas do sistema de tratamento.

- Fitas danificadas devem ser descartadas.

- h) no laboratório, retirar os tubos, sacos de tecido e/ou bolsas de sangue da caixa isotérmica e do saco autoclavável;
- i) retirar as preparações comerciais (fitas) dos tubos e/ou sacos de tecido e em seguida, introduzi-las na cabine de segurança biológica. Aguardar a secagem completa da embalagem de papel das fitas;
- j) em bolsas de sangue, fazer um corte com tesoura e com uma pinça, retirar a fita embalada em saco autoclavável. Retirar o excesso de sangue em água corrente e descontaminar a embalagem de saco autoclavável (contendo as fitas) com solução de ácido peracético, antes de introduzi-la na cabine de segurança biológica. Com o auxílio de uma tesoura estéril, abrir a embalagem plástica e retirar a preparação comercial;

- k) em condições de assepsia, com o auxílio de pinças estéreis, abrir a embalagem da preparação comercial e retirar a fita cuidadosamente, evitando-se o contato com a parte externa do invólucro. Inocular cada fita em um tubo de TSB, devidamente numerado;
- l) incubar os tubos de TSB com as fitas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  (*B. atropheus*) ou  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  (*G. stearothermophilus*) por até 7 dias;
- m) realizar leituras após 24 horas, 48 horas e 7 dias de incubação dos tubos das fitas teste e controle, observando a presença de crescimento microbiano no caldo triptona e soja (turvação). Os tubos com as fitas controle deverão apresentar turbidez após o período de incubação, indicando crescimento do organismo teste. Se for observada turbidez nos tubos de TSB inoculados com as fitas submetidas ao sistema de tratamento, deve-se proceder conforme descrito nas alíneas n a p;
- n) em condições de assepsia, estriar em duplicata a cultura dos tubos positivos em placas contendo ágar triptona e soja (TSA). Realizar o mesmo procedimento para a cultura de um dos tubos das fitas controle;
- o) colocar as placas em caixas plásticas, tampar hermeticamente e incubar a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  (*B. atropheus*) ou  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  (*G. stearothermophilus*) durante 48 horas;
- p) após o período de incubação, observar se houve crescimento de colônias típicas e/ou atípicas. Colônias típicas de *B. atropheus* possuem coloração negra, alaranjada ou esbranquiçada e as colônias típicas de *G. stearothermophilus* possuem coloração esbranquiçada (**Fig. 2**).

**Importante:**

- Os bioindicadores, após serem submetidos a estresse decorrente do processo de desinfecção, podem apresentar crescimento de colônias com características fenotípicas ligeiramente distintas das observadas no controle positivo (fitas controle).

**Figura 2 - Colônias típicas de *Geobacillus stearothermophilus* (esbranquiçadas) e *Bacillus atropheus* (alaranjadas)**



Fonte: CETESB (2015b)

## 12 Resultados

A interpretação dos resultados do teste de inativação microbiana deve ser realizada conforme **tabela 1**.

**Tabela 1 - Interpretação dos resultados dos testes de inativação microbiana em sistemas de tratamento térmico sem combustão na redução de 4 log<sub>10</sub> na concentração de esporos dos bioindicadores *Bacillus atrophaeus* ou *Geobacillus stearothermophilus***

Resultado	Interpretação
Fita com <b>ausência</b> de crescimento microbiano.	Inativação microbiana de nível III foi comprovada pela redução de 4 log <sub>10</sub> na concentração de esporos de <i>B. atrophaeus</i> ou <i>G. stearothermophilus</i>
Fita com <b>presença</b> de crescimento microbiano em TSB; e observação de colônias <b>típicas</b> na confirmação em TSA.	Não foi observada redução de 4 log <sub>10</sub> na concentração de esporos de <i>B. atrophaeus</i> ou <i>G. stearothermophilus</i> , não sendo comprovada inativação microbiana de nível III.
Fita com presença de crescimento microbiano em TSB; e observação de colônias <b>atípicas</b> na confirmação em TSA.	Possível ocorrência de contaminação externa. O resultado da análise da fita contaminada deve ser cancelado.
Fita controle com ausência de crescimento microbiano em TSB.	Possível problema com bioindicador ou ocorrência de erro analítico. O teste deve ser cancelado.

### Importante:

- Para o teste ser considerado válido, o número de perdas durante o ensaio (fitas danificadas, não recuperadas e/ou com resultado cancelado devido à contaminação externa) não deve ultrapassar 20% do número de fitas submetidas ao sistema de tratamento.

- O emprego de técnicas inadequadas de assepsia e a falta de procedimentos de controle de qualidade de esterilidade dos meios de cultura podem prejudicar a confiabilidade dos resultados, incorrendo em resultados falso-positivos, ou seja, presença de crescimento microbiano em TSB originada de contaminação externa ou cruzada. Nesses casos, nos quais existe a suspeita de contaminação externa, podem ser realizados testes complementares para detecção da presença de micro-organismos contaminantes ou para a identificação dos bioindicadores empregados no teste, bem como dos micro-organismos responsáveis pela contaminação. No entanto, a identificação somente pode ser realizada de forma conclusiva com a utilização de técnicas moleculares, como sequenciamento de DNA e espectrometria de massa.

## 13 Relatórios de Ensaio

Os relatórios de ensaio referentes a esse teste deverão conter no mínimo os seguintes itens:

- a) título;
- b) nome e endereço do laboratório executante;
- c) nome e endereço do cliente;
- d) identificação do sistema de tratamento avaliado (tipo, modelo, marca, número de série);
- e) dados do ensaio:
  - data do teste no equipamento;
  - hora da retirada das fitas do sistema de tratamento;
  - data e hora de início do ensaio laboratorial;
  - material de referência utilizado no ensaio (micro-organismo com respectivo n° ATCC);
  - concentração inicial das fitas de esporos;
  - número de fitas submetidas ao teste.
- f) resultados
  - tabela contendo a relação das fitas submetidas ao teste com indicação de presença ou ausência de crescimento de *Bacillus atrophaeus* ou *Geobacillus stearothermophilus* em cada fita analisada;
- g) identificação do método analítico;
- h) identificação e assinatura do responsável pela emissão do relatório de ensaio;
- i) data de emissão.

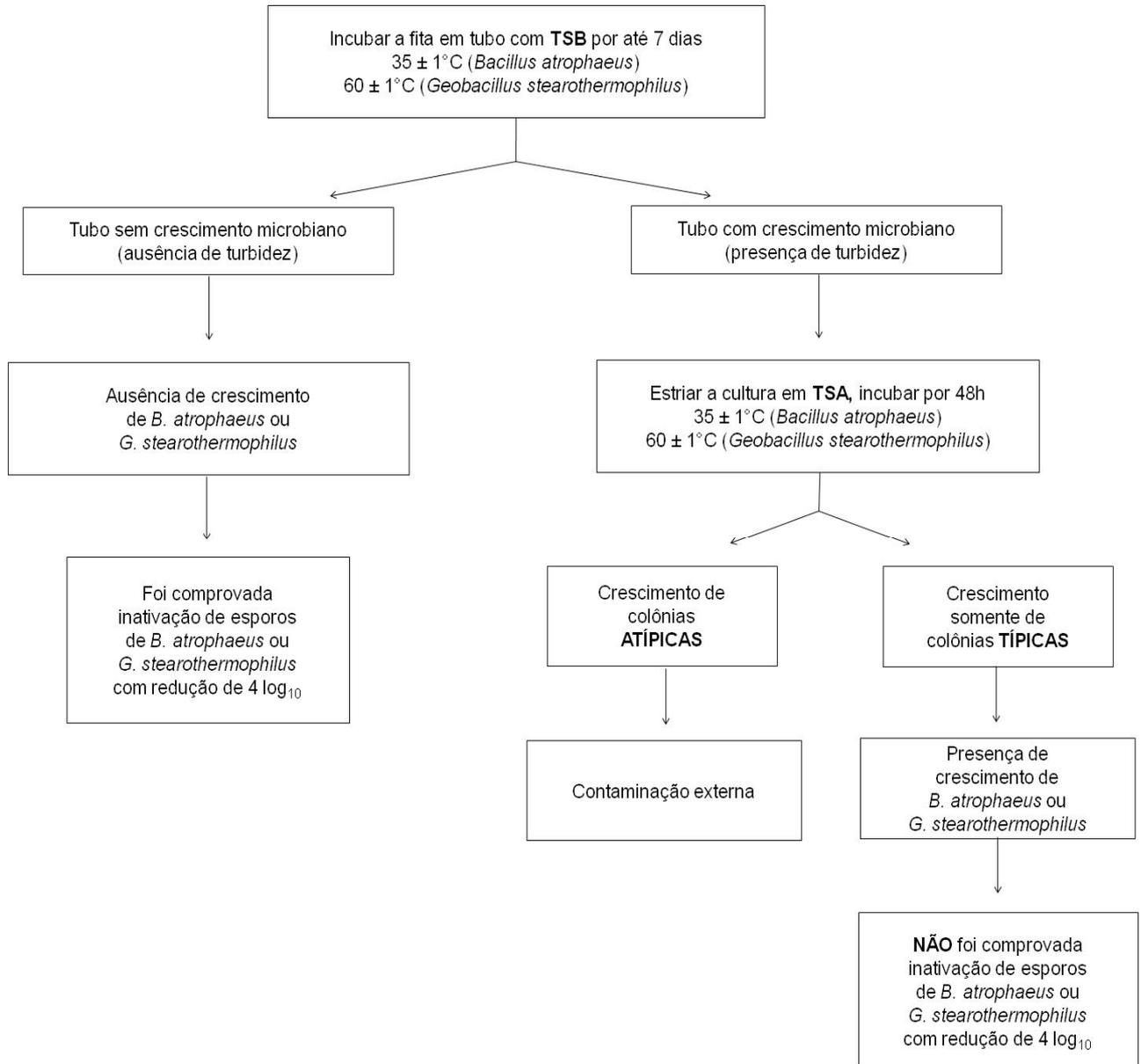
## Referências

- ATCC. ***Bacillus atrophaeus* [Nakamura] (ATCC® 9372™)**. Depositor N.R. Smith. Manassas, VA, USA, c2016. 2 p. Deposited as: *Bacillus subtilis* var. *niger* Smith et al. Documentation, Product sheet. (ATCC NRS 1221A). Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/9372.aspx#documentation>>. Acesso em: nov. 2016.
- CETESB. **Preparações comerciais contendo fitas de papel filtro impregnadas com 10<sup>4</sup> esporos de *Geobacillus stearothermophilus***. São Paulo, 2015a. 1 foto digital: color., JPEG, 5,71 MB. Largura: 4608 pixels, altura: 3072 pixels, 300 dpi.
- CETESB. **Colônias típicas de *Geobacillus stearothermophilus* (esbranquiçadas) e *Bacillus atrophaeus* (alaranjadas)**. São Paulo, 2015b. 1 foto digital: color., JPEG, 1,24 MB. Largura: 3360 pixels, altura 3062 pixels, 300 dpi.
- ERPI. **Technical assistance manual: state regulatory oversight of medical waste treatment technologies: a report of the State and Territorial Association on Alternative Treatment Technologies (STAATT)**. Palo Alto, CA, 1998. (TR-112222 Final Report). Report of the 2<sup>nd</sup> STAATT Conference. Disponível em: <[https://www.colorado.gov/pacific/sites/default/files/HM\\_mw-STAATT-II.pdf](https://www.colorado.gov/pacific/sites/default/files/HM_mw-STAATT-II.pdf)>. Acesso em: nov. 2016.
- FRITZE, D.,; PUKALL, R. Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, London, v. 51, n. 1, p. 35-37, Jan. 2001. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/deliver/fulltext/ijsem/51/1/0510035a.pdf?itemId=/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-1-35&mimeType=pdf&isFastTrackArticle=>>>. Acesso em: nov. 2016.
- NAZINA, T. N. et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of... **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, London, v. 51, n. 2, p. 433-446, Mar. 2001. Disponível em: <<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/51/2/0510433a.pdf?expires=1469721275&id=id&accname=guest&checksum=26BB7ED6640E09256E3F51F140E2BC02>>. Acesso em: nov. 2016.
- PENNA, T. C. et al. *Bacillus stearothermophilus* sporulation response to different composition media. **PDA J. Pharm. Sci. Technol.**, v. 52, n. 5, p. 198-208, Sep.-Oct. 1998.

...//ANEXO A

## Anexo A – Fluxograma

Fluxograma do teste de inativação microbiana para avaliação da redução de  $4 \log_{10}$  na concentração de esporos de *Bacillus atrophaeus* ou *Geobacillus stearothermophilus* em sistemas de tratamento térmico sem combustão<sup>1</sup>



<sup>1</sup> O teste somente será válido se as fitas controle apresentarem crescimento microbiano em TSB.