

Cabine de segurança biológica: efeito da luz ultravioleta nas micobactérias

Biological safety cabinet: ultraviolet radiation effect on mycobacteria

RIALA6/1094

Suely Yoko Mizuka UEKI^{1*}; Ana Livia GEREMIAS¹; Letícia Lisboa MONIZ¹; Fábio Oliveira LATRILHA¹; Artemir Coelho de BRITO¹; Carmen Maria Saraiva GIAMPAGLIA¹; Fernanda Cristina dos Santos SIMEÃO¹; Maria Alice Silva TELLES¹.

* Endereço para correspondência: ¹ Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Bacteriologia, Setor de Micobactérias. Av. Dr. Arnaldo, 351 9º andar CEP 01246-902, Cerqueira César, São Paulo, SP. E-mail: syueki@ial.sp.gov.br ou satie@osite.com.br

Recebido: 24/07/2006 – Aceito para publicação: 16/10/2006

RESUMO

A cabine de segurança biológica (CSB) é o principal equipamento para efetuar a contenção de aerossóis produzidos nos procedimentos laboratoriais e a descontaminação com lâmpada UV, 15 minutos antes do início das atividades e 15 minutos após utilização da cabine é parte das boas práticas de laboratório. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da lâmpada UV da CSB classe II B2, em diversas espécies de micobactérias e correlacionar com o tempo de exposição. Cepas de referência foram subcultivadas, semeadas e incubadas a 37°C até produzir turvação compatível com o tubo 1 da escala de MacFarland. Foram semeados 100µL de suspensão bacteriana em placas com meio 7H11; as placas foram cobertas parcialmente com papel alumínio e expostas à radiação UV durante 5 e 10 minutos. Após exposição, os papéis foram retirados e as placas incubadas a 37°C por 30 dias. Todas as placas apresentaram inibição de crescimento de bactérias na porção da placa em que houve exposição direta à radiação UV. Os resultados obtidos mostraram que a prática de utilização da radiação UV por 15 minutos após o uso da cabine e antes de iniciar outra atividade técnica, garante descontaminação adequada da CSB. Esta prática de biossegurança é recomendável para descontaminar a própria CSB e os materiais que são retirados da cabine.

Palavras-chaves. cabine de segurança biológica, luz ultravioleta, micobactérias.

ABSTRACT

Biological safety cabinet (BSC) is the major equipment which is the primary means of containment of infectious microorganisms aerosols generated from laboratory procedures, and the decontamination using ultraviolet radiation ; constitute a stage of Good Laboratory Practices. The objective of this study was to evaluate the effect of UV lamp of class II B2 cabinet on varied mycobacteria species and to correlate them with UV exposition time. Reference strains were subcultivated and incubated at 37°C until getting a turbidity equivalent to that of MacFarland 1 standard. From this bacterial suspension, 100µL were plated into 7H11 medium; the plates were partially covered with aluminium paper and exposed to UV radiation for 5 and 10 minutes. After UV exposition, the paper was removed and the plates were incubated at 37°C for 30 days. All plates showed no bacterial growth at the side exposed to the UV radiation, while a regular and abundant bacteria growth was observed at the other half part that was covered with paper. Switching on the UV lamp for 15 minutes after using the cabinet and for 15 minutes before starting any activity inside the cabinet guarantees proper decontamination. This biosafety practice is recommended to decontaminate the BSC and also materials that need to be withdrawn from the cabinet.

Key words. biological safety cabinet, UV radiation, mycobacteria.

INTRODUÇÃO

Em biossegurança, a contenção diz respeito aos métodos de segurança utilizados na manipulação de materiais infecciosos dentro de um laboratório, com o objetivo de eliminar ou reduzir a exposição dos trabalhadores e do ambiente aos agentes potencialmente perigosos. Três elementos de contenção são importantes: as boas práticas de laboratório, a escolha do equipamento de segurança adequado e o projeto de instalação. A combinação desses três elementos vai depender da avaliação de risco do trabalho a ser desenvolvido. O elemento de contenção mais importante são as boas práticas de laboratório, com a conscientização sobre os riscos potenciais que o material oferece ao manipulador. Quanto aos equipamentos, a cabine de segurança biológica (CSB) é o principal, capaz de proporcionar a contenção de aerossóis e borrifos gerados nos procedimentos laboratoriais. As CSB são classificadas em I, II (tipos A, B1, B2 e B3) e III. A escolha dependerá dos procedimentos necessários à classe de risco dos agentes biológicos a serem manipulados^{1,2}.

As instalações laboratoriais devem estar de acordo com as normas de biossegurança vigentes, contemplando a escolha da correta localização e a sinalização da área física destinada a tais atividades¹.

Por isso, o planejamento, a correta construção das instalações e o conhecimento do risco de transmissão do agente a ser manipulado, contribuem para a proteção da amostra em relação a contaminantes, da equipe do laboratório e do meio ambiente.

Mycobacterium tuberculosis e outras espécies do gênero *Mycobacterium* são os principais agentes infecciosos manipulados no laboratório de micobactérias. Estes bacilos podem ser encontrados em amostras de escarro, lavado gástrico, secreção brônquica, líquido cefalorraquidiano, urina, tecidos, sangue, medula óssea e outros. As micobactérias são classificadas como agentes biológicos de classes de risco 2 e 3, conforme a espécie. O *M. tuberculosis* e o *M. bovis* (exceto BCG vacinal) pertencem à classe 3 e as outras micobactérias não tuberculosas à classe 2. A exposição no laboratório aos aerossóis contendo estes bacilos é o risco de maior grau^{1,3}.

As boas práticas, os equipamentos de contenção e as instalações do nível de biossegurança 2 e 3 são indicados para a manipulação desses agentes e todas as atividades que formem aerossóis devem ser conduzidas em CSB classe II. As cabines de classe II (fluxo laminar vertical) possuem características especiais de fluxo de ar que proporcionam níveis de contenção que protegem o material sob análise, os funcionários do laboratório e o meio ambiente. A classe III oferece uma proteção máxima para os trabalhadores do laboratório, para a comunidade e para o meio. Atualmente, as cabines de classe I, estão sendo substituídas pela classe II⁴.

A maioria das CSB, além dos filtros HEPA e um sistema de direcionamento de ar, possuem uma lâmpada ultravioleta (UV) germicida. A constituição das lâmpadas germicidas é simples.

São lâmpadas fluorescentes comuns, sem a deposição de pó de vidro como cobertura interna, que seria responsável por transformar a radiação ultravioleta gerada pela lâmpada em luz visível. Sem essa cobertura a lâmpada emite apenas a radiação ultravioleta, capaz de matar microrganismos a ela expostos. Esta emite raios no comprimento de onda de 253,7nm, que é o comprimento com efeito bactericida⁵.

Os microrganismos atingidos pela radiação UV sofrem modificação no DNA ou RNA, pela formação de dímeros de pirimidina, que formados entre moléculas adjacentes, podem interromper a replicação ou a transcrição levando à morte da bactéria. Porém, a eficiência do uso da UV como um meio de descontaminação ainda é motivo de controvérsia já que a UV além de não penetrar em partículas, está limitada à distância entre a luz e o material exposto a ela, e ao tempo de exposição. Além disso, a exposição à UV é carcinogênica causando ceratoconjuntivite quando inadequadamente utilizada. Desta forma, a UV é frequentemente instalada em ambientes fechados, como por exemplo, dentro de CSB.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a ação germicida da lâmpada de luz UV da CSB classe II B2 utilizada no Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, sobre culturas de oito espécies de micobactérias expostas a luz por 5 e 10 minutos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas cepas de referência de micobactérias patogênicas e aquelas potencialmente ou raramente patogênicas, identificadas na rotina laboratorial por métodos moleculares e fenotípicos: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752, *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478, *Mycobacterium gordonae* ATCC 14470, *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium flavescens* ATCC 14474, *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium avium*.

As cepas de micobactérias foram subcultivadas em 5ml de meio Middlebrook 7H9 e incubadas durante 7 a 10 dias a 37°C. Havendo crescimento após este tempo, cada suspensão foi diluída com água destilada estéril e a turvação comparada à escala de MacFarland 1. Foram semeados, 100µl da diluição 10⁻⁴, em placas de Petri com meio Middlebrook 7H11. A suspensão foi espalhada homoganeamente sobre o meio, com uma alça descartável de 10µl. As placas foram cobertas parcialmente (1/2) com papel de alumínio estéril e colocadas nos 4 cantos e no centro da área de trabalho da CSB e expostas à luz UV. As placas foram semeadas em duplicata e expostas na luz UV, sendo que uma série ficou durante 5 minutos e a outra série, durante 10 minutos. Concomitantemente, foram preparadas mais três placas da mesma cepa, sendo uma totalmente fechada com a própria tampa e duas abertas sendo estas também expostas à luz UV durante 5 e 10 minutos e colocadas no centro da área de trabalho da CSB. Foram

realizados esfregaços de todas as cepas e corados pela técnica de Ziehl-Neelsen para confirmar micobactérias ou contaminação.

Após a exposição à luz UV, os papéis de alumínio foram retirados das placas parcialmente cobertas e todas (exceto a que estava coberta com a própria tampa) foram tampadas e incubadas a 37°C. O crescimento das colônias nas placas foi observado durante 5 a 20 dias de incubação. Uma nova leitura foi realizada após 30 dias.

Lâmpada germicida utilizada na CSB classe II B2: lâmpada de ultravioleta de baixa pressão de vapor de mercúrio com potência nominal de 30W (marca Phillips) de aproximadamente 2000 horas/uso e colocada na parte posterior da CSB numa altura de ± 50 cm das placas.

RESULTADOS

Todas as cepas semeadas nas placas com meio de Middlebrook 7H11 e expostas por 5 e 10 minutos, independente da localização em que foram colocadas dentro da CSB, tiveram o crescimento de micobactérias inibido pela luz UV (Figura 1). Ficou nitidamente visível o crescimento das colônias nas placas no lado em que as mesmas foram protegidas pelo papel de alumínio e a inibição total do crescimento no lado em que a mesma ficou exposta à luz UV. As placas totalmente expostas não apresentaram nenhum crescimento e as cobertas com a própria tampa apresentaram crescimento confluyente em toda superfície do meio em que foram semeadas.

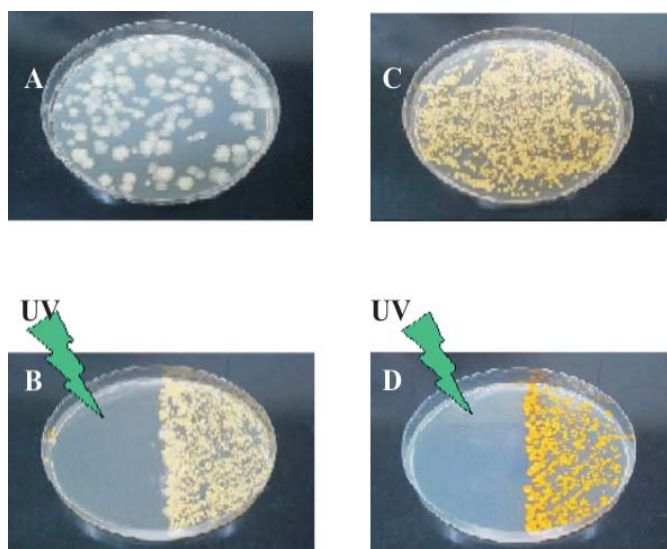


Figura 1. Efeito da exposição à luz ultravioleta sobre a sementeira de micobactérias. Placas tampadas (A e C) e semi-cobertas (B e D) expostas por 10 minutos. A e B: *M. chelonae*; C e D: *M. kansasii*.

Todas as placas foram observadas a partir de 5 dias de incubação e mantidas até 30 dias, para garantir ausência de crescimento tardio das colônias de micobactérias de crescimento lento

CONCLUSÃO E DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos nas condições do experimento, concluímos que a ação germicida da luz UV da CSB utilizada no Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz sobre as micobactérias foi efetiva mesmo quando a exposição foi no mínimo de 5 minutos. A prática laboratorial do Setor é ligar a lâmpada UV por 15 minutos após utilização da cabine e 15 minutos antes de iniciar outra atividade, o que garante uma descontaminação adequada da área de trabalho da CSB, desde que se realize uma manutenção periódica e a vida média da lâmpada seja bem controlada.

Embora essa prática seja rotineira nos laboratórios que trabalham em condições de risco biológico devido à aerossóis foi desaprovada pela Portaria nº 930/92 do Ministério da Saúde⁶. Entretanto, os resultados sugerem que o uso da lâmpada UV deveria ser um requisito importante, juntamente com as boas práticas e descontaminação química nas atividades laboratoriais, pois seu custo é baixo e de fácil manutenção.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo mostraram que após uma descontaminação química da CSB, com hipoclorito de sódio ou álcool etílico, para evitar contaminação cruzada ao manipular amostras contendo BAAR e cepas de diversas espécies de micobactérias, a utilização da lâmpada UV é uma prática recomendável visando:

- descontaminar a CSB no início e final das atividades laboratoriais.
- descontaminar a superfície dos materiais utilizados nestas atividades e que precisam ser retirados da CSB.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília, 2005.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com material biológico. Brasília, 2004.
3. Organización Panamericano de la Salud. Oficina Sanitária Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. 2002.
4. Ferreiros M. Cabines de segurança biológica. (www.sbcc.com.br). *Rev Elet SBCC* 2001; 14: 16-225.
5. Mastroeni M.F. Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde. São Paulo, Editora Atheneu, 2004.
6. Brasil. Leis, etc. Portaria nº 930, de 27 de agosto de 1992. Dispõe sobre normas para controle das infecções hospitalares. Diário Oficial [da] União, Brasília, Seção 1, pp. 12279-81, 04 de setembro de 1992.