

ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS DE BIOTÉRIO PELO CALOR ÚMIDO*

Sueli Blanes DAMY
Ubimara Pereira RODRIGUES
Luziane do C.A.G. CHAGURI
Glauco Bueno MACHADO
Carlos RIGHETTI NETO
Fernando SOGORB SANCHIS

RESUMO: Foram comprovados através de indicadores químicos e biológicos os melhores parâmetros de eficiência na esterilização de materiais usados em biotérios de condições sanitárias definidas. Obtiveram-se resultados satisfatórios em 20 minutos a 121°C para os seguintes materiais: gaiolas de polipropileno; maravalha de madeira em sacos de 5 quilos; ração em camadas de até 10cm; tampas de arame galvanizado; uniformes em pacotes de 15 x 25 x 38cm e em 60 minutos a 121°C para água em garrafas de vidro com 350ml de capacidade. Materiais para isoladores: 30 minutos a 121°C para ração em sacos de 1 quilo e maravalha de madeira em sacos de 1 quilo; 60 minutos a 121°C para água em garrafas de 350ml de capacidade. Houve coincidência (100%) entre indicadores químicos e biológicos o que permite a utilização imediata dos materiais orientando-se pelo controle químico (fusão do enxofre). Não foram avaliadas as variações dos valores nutricionais e organolépticos da ração.

UNITERMOS: *Autoclavagem, biotério, isoladores, indicadores biológicos e químicos*

INTRODUÇÃO

A esterilização pelo calor úmido, apesar de representar um dos métodos mais econômicos, deve ser utilizada com racionalidade em biotérios, devido à quantidade e diversidade de materiais a serem submetidos ao processo. Sua aplicação é fundamental em colônias de animais gnotobióticos.

* Trabalho apresentado no 1º Congresso Brasileiro de Animais de Laboratório 29/08 a 2/9/1988, Salvador, Bahia. Seção de Biotério - Instituto Butantan - C.P. 65 - 01051 - São Paulo - SP - Brasil. Recebido para publicação em 02/8/1989 e aceito em 27/11/1989.

cos, sendo, mesmo em criações convencionais, indispensável para a qualidade do modelo biológico produzido.

Para Ardouin & Morizet², os materiais utilizados podem ser divididos em três grupos: sólidos, líquidos e alimentos, sendo necessário prever para cada grupo processos adequados, compreendendo: eliminação do ar na câmara, entrada de vapor, esterilização, secagem e entrada de ar estéril.

A remoção do ar é o principal fator de sucesso do processo, uma vez que sua presença acarretará pontos frios no interior da massa a ser esterilizada. Para Joslyn⁵, das técnicas básicas utilizadas atualmente, a eliminação do ar por pulsos repetidos de vapor intercalados com vácuo, representa a mais eficiente, uma vez que elimina o intervalo de aquecimento entre a massa e a temperatura da câmara.

Na técnica de remoção por alto vácuo, a pressão absoluta do ar na câmara deve ser reduzida a valores de poucos milímetros de mercúrio, antes da admissão do vapor. Um perfeito vácuo é obtido quando atinge uma eliminação de 98%, porém, na prática, alguns autores reportaram resultados satisfatórios com pressão absoluta de 20mm Hg (Knox & Penikett⁶ e 50mm Hg Howie et al⁴).

Joslyn⁵ apresenta como inconveniente desta última técnica, a desidratação de materiais e o processo de oxidação que sofre o equipamento, provavelmente devido ao vapor superaquecido, provocado pelo ar residual que permanece na câmara, que além de promover o aparecimento de massas superaquecidas, atua como catalisador da reação de oxidação.

Nas etapas seguintes do processo, admissão de vapor e esterilização propriamente dita, para Cristovão & Gotillo³, é essencial que o vapor se encontre entre duas fases de agregação, a líquida e a gasosa. A mudança de uma fase para outra se faz à custa de grande troca de energia, fornecendo assim requisitos necessários à destruição térmica dos microrganismos.

A qualidade do vapor é fundamental, representando o peso do vapor seco na mistura e a quantidade de água presente. Se a qualidade do vapor for de 97%, significa que a mistura contém 97 partes de água no estado limiar e três no estado líquido. Vapor ideal contém 100% de saturação. A qualidade afeta o grau de esterilização e secagem do material (Joslyn⁵).

Quanto à secagem, o vácuo após esterilização provoca reevaporação de condensados. Segundo Howie et al⁴, vácuo de 50mm de Hg garante secagem satisfatória, se houver suplementação de vapor de boa qualidade. A admissão do ar deve ser através de filtros, evitando recontaminação.

Efeitos deletérios provocados pelo calor devem ser considerados, principalmente no que se relaciona a alimentos, desidratação de fibras no caso de uniformes; deformação de gaiolas de polipropileno e oxidação das tampas de metal utilizadas nas gaiolas.

Finalmente, a eficiência do processo poderá ser comprovada por métodos químicos, físicos e biológicos. Para Acker & Anderson¹, três princípios básicos envolvem o processo de validação de esterilidade: demonstração em nível máximo de probabilidade que o processamento e o método estabeleceram esterilidade em todas as unidades do lote; esterilidade no interior do produto; fornecimento de máxima segurança e suporte dos resultados dos testes do produto final esterilizado.

O sucesso da validação está na sistematização dos conhecimentos teóricos na execução do experimento validado e na análise da documentação. O emprego de bioindicadores tem como propósito assegurar que uma redução de sua população será suficiente para destruir toda contaminação viável da massa. (Acker & Anderson¹).

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer para cada grupo de material os melhores parâmetros de eficiência, comprovados através de indicadores biológicos e químicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Autoclave: de dupla porta, forma de paralelepípedo, capacidade 2m³, dupla parede, alimentada por vapor de água.

Gaiolas: de polipropileno (homopolímero KM 6.100), medindo 29 x 17,5 x 13cm, com oito extratores laterais e na parte superior da caixa dispositivo para drenagem de água. Colocadas em fileiras horizontais de 28 caixas, totalizando 224 por processo.

Tampas de gaiolas: em arame galvanizado, medindo 30 x 20cm, dispostas em pilhas contendo 10 cada, totalizando 500 tampas por processo.

Maravalha: em sacos multifolhados de papel kraft, grampeados, pesando 5 quilos cada, dispostos nas bandejas superior e inferior, totalizando 20 sacos ou 100 quilos por processo.

Ração: peletizada, na formulação industrial, disposta horizontalmente sobre as bandejas de maneira a formar camadas uniformes de 10cm de espessura no máximo, totalizando 300 quilos por processo.

Água: bebedouros de vidro com capacidade de 350ml, colocados em caixas de polipropileno, 24 por caixa, totalizando 336 bebedouros por processo.

Uniformes: pacotes medindo 15 x 38 x 25cm, envoltos em papel kraft.

Material para isoladores: ração e maravalha embalados em saco de algodão, com 1 quilo de capacidade, totalizando 2 quilos por cilindro. Água em bebedouros de 350ml, totalizando 8 por cilindro. Os cilindros são em aço inoxidável, contendo a porção média de seu corpo perfurações, envolvida com 4 camadas de lã de vidro, funcionando como filtro absoluto. A extremidade do cilindro foi fechada com papel celofane duplo.

Indicador químico: ampolas contendo 0,01g de enxofre (Ponto de fusão 119-120°C).

Indicador biológico: ampolas contendo 2 ml de uma suspensão de esporos de *Bacillus stearothermophilus* (MERCK ATCC 7953), com as seguintes características: $n = 1.000$ esporos por ml; $D_{120} = 8 \pm 1$ minuto; $D_{121} = 3 \pm 1$ minuto; $D_{122} = 1,5 \pm 1$ minuto; $F_{121} = 14$ a 15 minutos; $z = 4^\circ\text{C}$.

n = número de microrganismo por unidade de medida, antes do processo de esterilização.

D = tempo de redução (tempo em minutos para que uma determinada temperatura reduza em um décimo o número de esporos capazes de sobreviver).

F = tempo de destruição a 121°C (sob pressão de vapor).

z = inclinação da curva de destruição (diferença de temperatura em graus centígrados, em 1/10 do tempo de ação do calor para alcançar uma destruição de 90%).

Disposição dos indicadores na carga: maravalha, no centro de cada saco; gaiolas, nas extremidades e nas posições medianas de cada fileira; ração, no centro de cada saco; tampas, nas extremidades inferiores, superiores e medianas; água, no centro de cada caixa; uniformes e cilindros, no centro de cada pacote.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada grupo de material se estabeleceu inicialmente a carga máxima para a câmara da autoclave. Iniciou-se a validação de cada processo, com a temperatura de 121°C por 20 minutos. Os resultados das leituras dos indicadores químicos e biológicos foram confrontados e não ocorrendo correlação positiva entre eles, o tempo de esterilização foi aumentado gradualmente, até haver coincidência de resultados. A partir do estabelecimento deste parâmetro, o processo foi repetido 10 vezes para cada grupo. Os resultados estão representados na tabela 1.

Os tempos necessários à esterilização de cada grupo estão na dependência das características específicas do material, que provoca uma maior ou menor variação entre o tempo do início do patamar de esterilização e o aquecimento do centro da carga.

A água representou o grupo mais difícil no estabelecimento do tempo. Segundo Ardouin & Morizet², a variação deste item é grande, ocorrendo principalmente em função do volume dos bebedouros e em menor grau em função do número. O resfriamento requer 50 minutos para diminuir a temperatura de 160 litros, para 100°C e 11 horas para atingir 50°C.

Os resultados indicam que apesar do grau de vácuo registrado pelo manômetro externo de 600 mm Hg, correspondendo à pressão absoluta de 118 mm Hg, ter sido superior à preconizada por Knox & Penikett⁶ e Howie et al⁴, os dados fornecidos pelos indicadores orientam quanto às condições aproximadas do histórico do processo.

Se por um lado o indicador químico forneceu somente a informação que a temperatura atingida foi suficiente para provocar sua fusão, o indicador biológico, após 48 horas de incubação a 60°C, forneceu a informação do tempo mínimo que a temperatura se manteve. Na prática a coincidência de 100% verificada, demonstrou ser de valiosa importância, uma vez que permite a introdução de materiais na área protegida com barreira sanitárias, imediatamente após o término de cada processo de esterilização, orientando-se pela fusão do enxofre.

CONCLUSÃO

1. Os indicadores químico (enxofre) e biológico (esporos de *Bacillus stearothermophilus*, utilizados em conjunto, são eficazes na validação e monitoração de processos de esterilização por calor úmido.

Tabela 1

Parâmetros validados para materiais utilizados no Biotério Geral do Instituto Butantan, 1989

MATERIAL	VÁCUO		Tempo minuto	ESTERILIZAÇÃO		SECAGEM		RESFRIAMENTO Tempo minuto	RESULTADOS INDICADORES		
	Grau de vácuo mm Hg	Pressão absoluta mm Hg		Temperatura °C	Pressão mm Hg	Grau de vácuo mm Hg	Tempo minuto		Amostragem	Biol. ¹	Quím. ²
MATERIAL UTILIZADO EM ÁREA PROTEGIDA COM BARREIRAS SANITÁRIAS											
ÁGUA	600	118	60	121	775	—	—	960	140 -	140 F	10+
GAIOLAS	600	118	20	121	775	600	20	20	240 -	240 F	10+
MARVALHA	600	118	20	121	775	600	20	20	200 -	200 F	10+
RAÇÃO	600	118	20	121	775	600	30	30	100 -	100 F	10+
TAMPAS	600	118	20	121	775	600	20	30	100 -	100 F	10+
UNIFORMES	600	118	20	121	775	600	30	30	100 -	100 F	10+
MATERIAL UTILIZADO EM ISOLADORES											
ÁGUA	600	118	60	121	775	600	20	960	10 -	10 F	10+
MARVALHA	600	118	30	121	775	600	30	30	10 -	10 F	10+
RAÇÃO	600	118	30	121	775	600	30	30	10 -	10 F	10+

1 Sinal negativo para indicador biológico significa que não houve crescimento de esporos, após incubação da suspensão por 48 horas, a 60°C.

2 Sinal F para indicador químico significa que o enxofre fundiu.

3 Controle utilizado para cada processo, constituído de 1 ampola de bioindicador que não sofreu o processo de esterilização.

2. Os melhores parâmetros de eficiência são:

MATERIAL UTILIZADO EM ÁREA PROTEGIDA
COM BARREIRAS SANITÁRIAS

	TEMPO	TEMPERATURA
ÁGUA-bebedouros de 350 ml	60 minutos	121°C
GAIOLAS — polipropileno	20 minutos	121°C
MARAVALHA — sacos de 5 quilos	20 minutos	121°C
RAÇÃO — camadas de até 10 cm	20 minutos	121°C
TAMPAS	20 minutos	121°C
UNIFORMES — pacotes de 15 x 25 x 38cm	20 minutos	121°C

MATERIAL UTILIZADO EM ISOLADORES

ÁGUA — bebedouros de 350ml	60 minutos	121°C
RAÇÃO — sacos de 1 quilo	30 minutos	121°C
MARAVALHA — sacos de 1 quilo	30 minutos	121°C

ABSTRACT: By means of chemical and biological indicators, the best efficiency parameters for the sterilization of material used in laboratory animal house with definite sanitary conditions were confirmed. Satisfactory results were obtained within 20 min at 121°C for the following materials: polypropylene cages; wood shavings in 5 kg sacks; diet in layers of up to 10 cm; galvanized wire lids; uniforms in 10 x 25 x 38 cm parcels and within 60 min at 121°C for water in glass bottles of 350 ml content. Materials for isolators: 30 min at 121°C for water in bottles of 350 ml capacity. There was a coincidence (100%) between chemical and biological indicators thus allowing the immediate utilization of the material under the orientation of chemical control (fusion of the sulphur). The variations of the nutritional and organoleptic values of the diet were not evaluated.

KEYWORDS: autoclave, laboratory animal house, isolators, chemical and biological indicators.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKER, M.J. & ANDERSON, N.R. Validation of sterile products. In: LOFTUS, B.T. & NASCH, R.A. ed. *Pharmaceutical process validation*. New York, Marcel Dekker, 1984. p. 29-98.
2. ARDOUIN, P. & MORIZET, J. Du bon usage de l'autoclave dans les unités animales. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 9(2):95-104, 1984.
3. CRISTOVÃO, D. A. & GOTILLO, L. Esterilização e desinfecção. São Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública — USP, 1968. 48p.
4. HOWIE, J. W. et al. Sterilization by steam under increased pressure. *The Lancet*, 1(7070):425-435, 1959.
5. JOSLYN, L. J. Sterilization by heat. In: BLOCK, S. A. ed. *Disinfection, sterilization and preservation*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983. p. 3-46.
6. KNOX, R. & PENIKETT, E. J. K. Influence of initial vacuum on steam sterilization of dressings. *Brit. med. J.*, 1:680-682, 1958.