



**ABNT-Associação
Brasileira de
Normas Técnicas**

Sede:
Rio de Janeiro
Av. Treze de Maio, 13 - 28º andar
CEP 20003 - Caixa Postal 1680
Rio de Janeiro - RJ
Tel.: PABX (021) 210-3122
Telex: (021) 34333 ABNT-BR
Endereço Telegráfico:
NORMATÉCNICA

Copyright © 1990,
ABNT-Associação Brasileira
de Normas Técnicas
Printed in Brazil/
Impresso no Brasil
Todos os direitos reservados

CDU: 663.1:542.2:614.48

MAIO/1990

NB-1295

Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia

Procedimento

Registrada no INMETRO como NBR 11257
NBR 3 - Norma Brasileira Registrada

Origem: Projeto 13:10.02-032/88
CB-13 - Comitê Brasileiro de Alimentos e Bebidas
CE-13:10.02 - Comissão de Estudo de Métodos Analíticos
NB-1295 - Microbiological laboratory materials - Cleaning and sterilization - Procedure

Palavras-chave: Artigo de laboratório. Microbiologia. Laboratório | 4 páginas

1 Objetivo

Esta Norma fixa as condições exigíveis para lavar, preparar e esterilizar os vários tipos de vidrarias e materiais usados para ensaios microbiológicos.

2 Condições gerais

Para o preparo de materiais a serem utilizados em ensaios microbiológicos, visando completa assepsia e esterilização, é necessária a utilização dos seguintes acessórios e reagentes.

2.1 Acessórios

2.1.1 Algodão hidrófobo.

2.1.2 Autoclave.

2.1.3 Balança semi-analítica, com legibilidade de 0,1 g.

2.1.4 Balões volumétricos de 1000 mL, de borossilicato ou vidro neutro.

2.1.5 Bandejas de aço inoxidável.

2.1.6 Bastões de vidro.

2.1.7 Destilador para água.

2.1.8 Escovetes de tamanhos diversos.

2.1.9 Esponjas de aço, de espuma e de fibra sintética.

2.1.10 Espátulas de aço inoxidável.

2.1.11 Estufa para esterilização e secagem, equipada com termômetro e termostato.

2.1.12 Folha de papel alumínio ou papel Kraft.

2.1.13 Lavador automático de pipetas.

2.1.14 Luvas de amianto ou raspa de couro.

2.1.15 Luvas de borracha.

2.1.16 Proveta graduada de 1000 mL, de borossilicato ou vidro neutro.

2.1.17 Tesoura.

2.1.18 Pinças de aço inoxidável.

2.1.19 Indicadores de esterilização (fita, tinta ou ampola com suspensão de esporos de *Bacillus stearothermophilus*).

2.1.20 Bico de Bunsen.

2.1.21 Tripé.

2.1.22 Tela de amianto de 22 cm de diâmetro.

2.1.23 Béqueres de borossilicato ou vidro neutro.

2.1.24 Estilete de ponta fina.

2.1.25 Cestas de arame de aço inoxidável para acondicionar tubos de ensaios para esterilização.

2.1.26 Barbante, cordonê ou fita adesiva tipo crepe.

2.1.27 Gaze.

2.1.28 Cestas de aço inoxidável com fundo perfurado para secagem de material.

2.1.29 Porta-placas de Petri em aço inoxidável ou alumínio, com tampa.

2.1.30 Porta-pipetas, em aço inoxidável ou alumínio, com tampa.

2.2 Reagentes

2.2.1 Dicromato de potássio.

2.2.2 Ácido sulfúrico.

2.2.3 Água destilada.

2.2.4 Detergente neutro, líquido ou em pó, atóxico e biodegradável.

2.2.5 Meio de cultura adequado à cepa padrão utilizada no teste de características inibidoras do detergente.

2.3 Preparo das soluções

2.3.1 Mistura sulfocrômica

dicromato de potássio 60 g

ácido sulfúrico 800 mL

água destilada 200 mL

Dissolver o dicromato de potássio em água destilada quente e deixar esfriar. Colocar o recipiente em água fria ou banho de gelo. Adicionar lentamente o ácido sulfúrico, com agitação constante.

3 Condições específicas

3.1 Descontaminação do material

Antes da lavagem, todo o material contaminado deve ser esterilizado em autoclave, a 121°C, por 30 min.

3.2 Preparo de provetas, balões, frascos de Erlenmeyer, béqueres e funis

3.2.1 Lavagem

3.2.1.1 Lavar com água e detergente, utilizando esponja e escovete.

3.2.1.2 Caso os materiais apresentem incrustações ou resíduos gordurosos, proceder à imersão destes em solução sulfocrômica.

3.2.1.3 Enxaguar dez vezes com água corrente, enchendo e esvaziando totalmente a vidraria.

3.2.1.4 Utilizar, no último enxágüe, água destilada.

3.2.1.5 Deixar drenar a água das vidrarias em cestas de aço inoxidável com fundo perfurado.

3.2.1.6 Secar em estufa a 100°C.

3.2.2 Preparo e esterilização

3.2.2.1 Colocar tampão de algodão hidrófobo e gaze no bocal dos balões e frascos de Erlenmeyer. Cobrir com folha de alumínio ou papel Kraft e fixar com barbante, cordonê ou fita adesiva tipo crepe.

3.2.2.2 Cobrir os bocais e as hastes dos funis e os bocais das provetas e dos béqueres com folha de alumínio ou papel Kraft e fixar com barbante, cordonê ou fita adesiva tipo crepe.

3.2.2.3 Identificar o material com data de esterilização e prova de esterilização.

3.2.2.4 Esterilizar em autoclave a 121°C, por 30 min, ou em estufa a 170°C - 180°C por 2 h.

Nota: Frascos destinados ao preparo de meios de cultura, que são submetidos à autoclavagem, dispensam esterilização prévia.

3.3 Preparo de placas de Petri autoclaváveis

3.3.1 Lavagem

3.3.1.1 Retirar o ágar com auxílio de espátula.

3.3.1.2 Lavar com água corrente, detergente e esponja, retirando todos os resíduos do interior da tampa e fundo das placas, assim como todas as marcas externas.

3.3.1.3 Enxaguar aproximadamente dez vezes em água corrente.

3.3.1.4 Utilizar no último enxágüe água destilada.

3.3.1.5 Colocar em bandejas as placas emborcadas (tampas e fundos) e secar em estufa à temperatura compatível com o tipo de material usado nestas e por tempo necessário à operação.

3.3.2 Esterilização

3.3.2.1 Juntar tampa e fundo adequadamente e acondicionar para esterilização em porta-placas ou embrulhar individualmente, ou em grupos de dez, em papel Kraft.

3.3.2.2 Identificar o material e datar. Colocar indicador de esterilização.

3.3.2.3 Esterilizar em estufa a 160°C, por 2 h, ou a 180°C, por 1 h, ou em autoclave por 30 min, secando em seguida em estufa a 100°C, pois a esterilização pelo calor seco não é compatível com todos os tipos de materiais.

3.4 Preparo de pipetas

3.4.1 Lavagem

3.4.1.1 Retirar o algodão do bocal de cada pipeta com estilete de ponta fina ou pinça.

3.4.1.2 Imergir as pipetas em solução detergente por 24 h.

3.4.1.3 Enxaguar em água corrente.

3.4.1.4 Imergir em solução sulfocrômica até total eliminação dos resíduos.

3.4.1.5 Transferir para lavador automático de pipetas e lavar por tempo necessário à remoção dos resíduos.

3.4.1.6 Enxaguar com água destilada.

3.4.1.7 Secar em estufa a 100°C.

3.4.2 Esterilização

3.4.2.1 Colocar algodão hidrófobo no bocal das pipetas.

3.4.2.2 Acondicionar em porta-pipetas ou embrulhar individualmente em papel Kraft.

3.4.2.3 Identificar o material com nome, volume, data de esterilização e prova de esterilização.

3.4.2.4 Esterilizar em autoclave a 121°C, por 30 min, ou em estufa a 160°C, por 2 h, ou 180°C, por 1 h.

3.5 Preparo de tubos de Durham

3.5.1 Lavagem

3.5.1.1 Lavar os tubos com água e detergente.

3.5.1.2 Colocar, se necessário, os tubos em recipiente com solução sulfocrômica até total eliminação dos resíduos.

3.5.1.3 Enxaguar dez vezes em água corrente, enchendo e esvaziando totalmente os tubos.

3.5.1.4 Utilizar, no último enxágüe, água destilada.

3.5.1.5 Secar em estufa a 100°C. Os tubos de Durham dispensam prévia esterilização.

3.6 Preparo de tubos de ensalo

3.6.1 Tubos de ensalo com tampas rosqueadas

3.6.1.1 Lavagem

3.6.1.1.1 Esvaziar o conteúdo do tubo e lavar com água e detergente, utilizando escovetes e esponjas para retirar as marcas externas e resíduos internos.

3.6.1.1.2 Enxaguar em água corrente.

3.6.1.1.3 Colocar, se necessário, os tubos em recipiente contendo solução sulfocrômica até total eliminação dos resíduos.

3.6.1.1.4 Enxaguar e lavar com água e detergente.

3.6.1.1.5 Enxaguar dez vezes em água corrente, enchendo e esvaziando totalmente os tubos.

3.6.1.1.6 Utilizar, no último enxágüe, água destilada.

3.6.1.1.7 Deixar escorrer bem toda a água, colocar os tubos em cesta de aço inoxidável perfurada em posição emborcada, secar em estufa a 100°C.

Nota: As tampas devem ser fervidas em água e detergente, enxaguadas e secas em estufa a 100°C.

3.6.1.2 Esterilização

Nota: Este procedimento só é necessário quando os tubos são

utilizados para conter meios de cultura já estéreis ou que não precisam ser esterilizados, bem como para soluções e/ou em ensaios complementares específicos.

3.6.1.2.1 Vedar os tubos secos com as tampas, acondicionar em cestas de arame e esterilizar em autoclave a 121°C, por 30 min, ou em estufa a 160°C, por 2 h, ou a 180°C, por 1 h.

3.6.2 Tubos de ensalo comuns

3.6.2.1 Lavagem

3.6.2.1.1 Proceder à lavagem segundo as técnicas recomendadas nos itens 3.6.1.1.1 a 3.6.1.1.7 (exceto Nota).

3.6.2.2 Esterilização

Nota: Este procedimento não é necessário quando os tubos são utilizados para conter meios de cultura já estéreis ou que não precisam ser esterilizados, bem como para soluções e/ou em ensaios complementares específicos.

3.6.2.2.1 Colocar tampas de algodão hidrófobo e gaze no bocal de cada tubo.

3.6.2.2.2 Acondicionar em cestas de arame e cobrir com papel Kraft.

3.6.2.2.3 Proceder à esterilização em autoclave a 121°C, por 30 min, ou em estufa a 160°C, por 2 h, ou 180°C, por 1 h.

3.7 Preparo e esterilização de pinças

3.7.1 Embrulhar individualmente as pinças em papel Kraft ou papel alumínio.

3.7.2 Identificar com nome, data de esterilização e prova de esterilização.

3.7.3 Esterilizar em autoclaves a 121°C, por 30 min, ou em estufa a 160°C, por 2 h, ou 180°C, por 1 h.

4 Teste de características inibidoras do detergente usado na limpeza do material

4.1 Lavar seis placas de Petri de acordo com o sistema usual e designar como Grupo A.

4.2 Lavar seis placas de Petri de acordo com o sistema usual, enxaguar doze vezes com porções de água destilada e designar como Grupo B.

4.3 Imergir seis placas de Petri na solução detergente em uso (na concentração usual), secar sem enxaguar e designar como Grupo C.

4.4 Esterilizar os Grupos A, B e C nas condições usuais.

4.5 Para testar o material já esterilizado, separar seis placas de Petri e designar como Grupo D.

4.6 Preparar uma suspensão de uma cepa padrão contendo de 50 UFC/mL a 150 UFC/mL. Pipetar 1 mL desta suspensão para cada uma das placas, verter o meio da cultura adequado à cepa padrão e incubar, também à temperatura adequada.

avaliados em cada laboratório, e a escolha deve recair sobre o microorganismo mais sensível.

4.7 Interpretação dos resultados

4.7.1 Calcular a média das contagens obtidas em cada grupo.

4.7.2 Se a diferença entre as médias obtidas entre os Grupos A, B, C e D for inferior a 15%, o detergente não é tóxico nem tem características inibidoras, portanto o material pré-esterilizado está aceitável.

4.7.3 Se a diferença das médias entre os Grupos A e B ou D e B for de 15% ou mais, indica presença de resíduos inibidores.

4.7.4 Discordâncias nas médias de menos de 15% entre A e B e mais de 15% entre A e C indicam que o detergente tem propriedades de inibição que são eliminadas durante as lavagens de rotina.

Nota: Caso o resultado do teste indique presença de resíduos inibidores, o detergente deve ser substituído.
