

Avaliação da ação germicida da luz ultravioleta de cabine de segurança biológica frente às espécies bacterianas

Evaluation of the germicidal action of ultraviolet light in biosafety cabinet concerning bacterial species

Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa¹ , Mariana Priscila de Camargo² , Julie Anne Corrêa de Magalhães Tavares Moreira² , Rafael Balan Diman³ , Mônica da Silveira⁴ 

RESUMO

Introdução: A cabine de segurança biológica (CBS) é um equipamento de proteção coletiva, utilizado para efetuar a contenção de aerossóis produzidos nos procedimentos laboratoriais. A CBS protege tanto os trabalhadores, quanto o material manipulado e o meio ambiente. Dispõe de lâmpadas de luz ultravioleta (UV) que possui ação germicida, alterando os ácidos nucleicos dos micro-organismos. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação germicida da luz UV da CBS classe II, tipo A2, frente à cultura de duas espécies de bactérias com diferentes condições de exposição a luz UV. **Material e Métodos:** Para o desenvolvimento da pesquisa foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, na concentração de $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias/ml (UFC/ml), que após a semeadura em biplacas de Petri foram expostas à luz UV em diferentes condições e tempos. **Resultados:** Os resultados obtidos revelaram que as espécies de bactérias apresentaram igual perfil de crescimento ou inibição quando submetidas às diferentes condições de exposição. As biplacas de Petri com as tampas abertas e protegidas ou não com embalagem de esterilização apresentaram, nos tempos 15 e 20 minutos, inibição bacteriana. Nas biplacas protegidas pelo papel alumínio e nas biplacas com a tampa fechada, independentemente do tempo e da condição, os micro-organismos apresentaram crescimento bacteriano. **Conclusão:** Com os resultados obtidos, sugere-se que a ação germicida da luz UV foi eficaz, garantindo a descontaminação adequada e assegurando a qualidade na biossegurança laboratorial.

Palavras-chave: Cabine de Segurança Biológica; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; Luz Ultravioleta.

ABSTRACT

Introduction: The biological safety cabinet (BSC) is a collective protective device used to hold aerosols produced in laboratory procedures. The BSC protects workers, material handling, and the environment. It relies on ultraviolet light (UV) lamps that have germicidal action, altering the nucleic acids of microorganisms. **Objective:** The objective of the present study was to evaluate the germicidal action of BSC class II type A2 UV light against the culture of two bacterial species with different conditions of exposure to UV light. **Methods:** For the research, the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 were used, at a concentration of 1.5×10^8 Colony Forming Units/ml (CFU/ml), which were seeded in Petri biplates. Use UV light under different conditions and times. **Results:** The bacterial species showed the same growth or inhibition profile when subjected to different exposure conditions. Petri dishes with the cover open and protected or not with sterilization packaging showed bacterial inhibition at 15 and 20 minutes. The microorganisms in the biplates protected by the aluminum foil and in the biplates with the cover on, regardless of the time and condition, showed bacterial growth. **Conclusion:** With the results obtained, it is suggested that the germicidal action of UV light was effective, ensuring adequate decontamination and ensuring quality in laboratory biosafety.

Keywords: Biosafety Cabinet; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; UV Light.

¹ Pós-doutorado em Doenças Tropicais pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- UNESP Botucatu. Docente na Faculdade de Tecnologia de Bauru- FATEC Bauru.

² Tecnólogo em Sistemas Biomédicos pela Faculdade de Tecnologia de Bauru- FATEC Bauru, SP.

³ Professor e Tecnólogo em Sistemas Biomédicos pela Faculdade de Tecnologia de Bauru- FATEC Bauru, SP.

⁴ Pós-doutoranda em Doenças Tropicais pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho- UNESP Botucatu. Hospital Estadual de Bauru, SP.

INTRODUÇÃO

Os riscos biológicos são os que geram maior preocupação aos profissionais de saúde, pois em uma eventual exposição ocupacional a agentes patogênicos podem ocasionar uma possível infecção.¹

Neste cenário, os conceitos de biossegurança são introduzidos como sendo um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal e o meio ambiente, sendo o seu objetivo principal a criação de um ambiente de trabalho onde se promova a contenção do risco de exposição a agentes potencialmente nocivos ao trabalhador e o meio ambiente.²

Três elementos de contenção são importantes na biossegurança: 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.³

As cabines de segurança biológica (CSB) são equipamentos de proteção coletiva, utilizados para proporcionar a contenção de aerossóis, provocados por procedimentos com agentes infecciosos e/ou químicos.⁴ Existem três tipos gerais de cabines (classes I, II e III) que possuem características e aplicações diferenciadas.

A CSB Classe I oferece proteção ao operador e ao meio ambiente, mas não protege o produto a ser manipulado. É uma cabine ventilada de pressão negativa, cujo o ar ambiente é aspirado através da abertura frontal e da grelha na superfície de trabalho a uma mínima velocidade de 75 pés lineares por minuto (lfpm), que corresponde a 0,38 m/s. O ar exaurido passa previamente por um filtro HEPA antes de deixar a cabine.^{5,6}

As CSBs Classe II são divididas de acordo com sua característica construtiva, velocidades e configuração do fluxo de ar e pelo seu sistema de exaustão. Eles fornecem proteção ao operador, ao meio ambiente e ao produto manipulado. O fluxo de ar interior apresenta velocidade de 75 a 100 lfpm, com uma corrente laminar vertical, saída de ar com exaustão e um sistema de filtração por meio do filtro HEPA.⁵ O fluxo de ar é direcionado para as grades frontais e ao fundo da área de trabalho da cabine. O ar de exaustão, de alguns modelos, deve

ser descarregado diretamente para o exterior, através de uma conexão completa e rígida.⁷

A CSB Classe III foi projetada para o trabalho com agentes microbiológicos altamente infecciosos e para a realização de operações de alto risco, oferecendo máxima proteção ao meio ambiente e ao operador. Essa cabine é composta de um módulo lacrado à prova de gás e um visor de observação.⁴

Em uma cabine Classe III, tanto o ar insuflado como o ar exaurido são filtrados por filtros HEPA. O ar de exaustão deve passar através de dois filtros HEPA, ou um filtro HEPA e um incinerador de ar, antes da descarga diretamente para o exterior. Em cabines Classe III não se processa a extração do ar por meio do sistema de exaustão geral do laboratório. O fluxo de ar é mantido por um sistema de exaustão exterior dedicado para a cabine que mantém sob pressão negativa mínima de 125 Pa (mínimo de 0,5"WG).⁷

A CSB possui componentes de extrema importância, tais com o filtro *High Efficiency Particulate Air* (HEPA) que apresenta uma eficiência de filtração de 99,93% de partículas e a lâmpada de luz ultravioleta (UV). A junção desses componentes protege o trabalhador do material que está sendo manipulado.⁵

A radiação ultravioleta é composta por diferentes comprimentos de ondas eletromagnéticas e é dividida em: UV-A: 320-400 nanômetros (nm), UV-B: 290-320 nm e UV-C: 15-290nm. A UV-A é subdividida em UV-A I (340-400nm) e UV-A II (320-340nm) e a faixa de UV-B é subdividida em UV-B de banda larga (290-320 nm) e UV-B de banda estreita (311- 313 nm).⁸

Na UV-C, o intervalo de comprimento de onda entre 235 a 285nm é ideal para ação germicida inativando os micro-organismos, sendo utilizadas também em superfícies de salas cirúrgicas e em salas assépticas.⁸

Segundo Halstead *et al.* (2019)⁹, a luz UV é capaz de danificar o ácido nucleico (DNA e RNA) de diversos de micro-organismos. Além disso, a sobrevivência de um micro-organismo exposto à luz UV varia em função do tempo aplicado.

Considerando essa característica germicida da luz UV, o presente estudo avaliou a eliminação do micro-organismo quando exposto à luz UV na CBS, visando garantir qualidade na biossegurança laboratorial, frente às culturas de duas espécies

bacterianas em diferentes condições e tempos expostas à luz UV.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Tecnologia de Bauru – FATEC/Bauru. Foram testadas cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) das seguintes bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 expostas à luz ultravioleta (modelo TVU 30W/g30 T8, marca Philips, Varginha, Brasil), através da cabine de segurança biológica (modelo Biosafe 12, Classe II tipo A2, marca Veco, Campinas, Brasil).

As cepas bacterianas foram subcultivadas em biplaca de Petri com o meio de cultura ágar sangue para crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e o ágar MacConkey para desenvolvimento das bactérias *Klebsiella pneumoniae*, utilizando para semeadura alça descartável de 10µ, após foram incubadas em estufa microbiológica a 37 °C por 24 horas.

Após este tempo, foi realizada a preparação da suspensão bacteriana através de uma diluição contendo salina a 0,9% estéril para cada cepa, com uma concentração de $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias/ml (UFC/ml).

Para controle do crescimento bacteriano da turvação as diferentes cepas foram semeadas em duplicada e incubadas em estufa microbiológica a 37 °C por até 24 horas.

Cada suspensão bacteriana foi semeada em duplicada para realização da exposição à luz UV nas seguintes condições: biplaca aberta e fechada, biplaca protegida com embalagem de esterilização com a tampa aberta e fechada e biplaca protegida com papel alumínio com a tampa aberta e fechada. Esses procedimentos foram realizados para cada bactéria e nos tempos 5, 10, 15 e 20 minutos.

Após cada exposição, as biplacas foram incubadas em estufa microbiológica a 37 °C por 24 horas.

RESULTADOS

Os resultados obtidos em duplicado revelaram que as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 apresentaram igual perfil de crescimento ou inibição quando submetidas aos diferentes estímulos de exposição.

As biplacas de Petri com a tampa aberta e protegidas ou não com embalagem de esterilização apresentaram crescimento na exposição 5 e 10 minutos; nos tempos 15 e 20 minutos o crescimento bacteriano foi inibido. As biplacas de Petri com a tampa fechada e protegidas ou não com embalagem de esterilização apresentaram crescimento independente do tempo de exposição, como consta na Tabela 1.

As biplacas protegidas com papel alumínio, com a tampa aberta e fechada, apresentaram crescimento de colônias independente do tempo de exposição, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1

Resultados da exposição à luz ultravioleta em diferentes condições e tempos.

| Condições | 5 minutos | 10 minutos | 15 minutos | 20 minutos |
|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| TA | CB | CB | NC | NC |
| TF | ICB | ICB | ICB | ICB |
| TAEE | CB | CB | NC | NC |
| TFEE | ICB | ICB | ICB | ICB |
| TAPA | ICB | ICB | ICB | ICB |
| TFPA | ICB | ICB | ICB | ICB |

CB: houve crescimento bacteriano; NC: não houve crescimento bacteriano; ICB: incontáveis crescimentos bacterianos; TA: tampa aberta; TF: tampa fechada; TAEE: tampa aberta protegida com embalagem de esterilização; TFEE: tampa fechada protegida com embalagem de esterilização com a tampa fechada; TAPA: tampa aberta protegida com papel alumínio; TFPA: tampa fechada protegida com papel alumínio.

DISCUSSÃO

As cabines de segurança biológica são essenciais no trabalho seguro com agentes infecciosos e químicos. Para assegurar o trabalho seguro e a prevenção de infecções são fundamentais a manipulação e a manutenção corretas do equipamento.^{10,11}

A CSB tem como componente a luz UV, que promove a inativação dos micro-organismos, a irradiação altera os ácidos nucleicos dos agentes infecciosos, sem necessidade de produtos químicos.⁸

O presente trabalho demonstrou que as diferentes bactérias se comportaram de modo semelhante nas diversas condições de procedimentos e tempo. Esse fato ficou comprovado pelo crescimento ou inibição das colônias bacterianas nas placas durante a realização dos testes.

Pesquisa desenvolvida por Ueki *et al.* (2008)¹² com descontaminação das CSB com álcool 70% e exposição à luz UV por 15 minutos, revelou ser efetiva, pois, houve crescimento de apenas uma ou duas colônias de fungos e outros micro-organismos, não havendo crescimento de micobactérias. Suas observações foram concordantes com os resultados do presente estudo, que após a exposição à luz UV por diferentes tempos e condições foram observados a inibição do crescimento bacteriano.

Trabalho realizado por Ueki *et al.* (2006)¹³ demonstrou que a UV foi efetiva na eliminação de micobactérias expostas diretamente por no mínimo cinco minutos. Fato esse observado no presente estudo que a exposição a UV com placa com a tampa aberta obteve crescimento reduzido de micro-organismo já nos primeiros 5 minutos de exposição.

Resultados semelhantes ao presente estudo foram publicados por Harrington *et al.* (2007)¹⁴ em pesquisa realizada para avaliação da luz UV na CSB com cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, concluindo a eficácia da ação germicida da luz UV em CSB.

Pelos resultados obtidos nas condições do experimento, concluímos que a ação germicida da luz UV da CSB foi efetiva. A recomendação dos Manuais do Ministério da Saúde² sugere, para garantir uma descontaminação adequada da área de trabalho, ligar a luz UV por 15 minutos antes e

após utilização da CSB e as superfícies devem ser sempre limpas e descontaminadas quimicamente por descontaminantes sempre antes e principalmente após o uso das CSB.

Entretanto, os resultados sugerem que o uso da luz UV deve ser um requisito importante com as boas práticas laboratoriais para garantir a biossegurança laboratorial.

CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, concluímos que a ação germicida da luz UV da CSB foi eficaz, garantindo a descontaminação adequada, conforme proposto durante o desenvolvimento do trabalho, sendo essa prática recomendável para assegurar qualidade na biossegurança laboratorial.

REFERÊNCIAS

1. Moura ML, Guimarães V. Biosafety in Research: Importance of Protecting the Environment and Health. *Sumerianz Journal of Agriculture and Veterinary*. 2019; 2(2): 10-15. Disponível em: [https://www.sumerianz.com/pdf-files/sjav2\(2\)10-15.pdf](https://www.sumerianz.com/pdf-files/sjav2(2)10-15.pdf)
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Biocontenção: o gerenciamento do risco em ambientes de alta contensão biológica NB3 e NBA3 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2015. 134 p.: il. Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/biocontencao_gerenciamento_risco_ambientes_alta_contencao.pdf
3. Miring'u G, Bundi M, Muriithi BK, Apondi EW, Galata AA, Kathiiko CN, et al. Knowledge and Practices Regarding Usage of Biological Safety Cabinets. *Applied Biosafety*. 2017; 22(1):38-43. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1535676016685790>
4. Sumit G, Jeffrey V, Terrance W, Terrance N. Developing an In-House Biological Safety Cabinet Certification Program at the University of North Dakota. *Applied Biosafety: Journal of ABSA International*. 2019; 24(3): 153-160. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1535676019859787>
5. Reda SM. A Technique to Evaluate the Effectiveness of UV Lamps Performance in Biological Cabinet. *International Journal of Pure and Applied Physics*. 2012; 8(1):45-51. Disponível em: http://www.ripublication.com/ijpapv3/ijpapv8n1_07.pdf
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento

- do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. Biossegurança em Saúde: prioridades e estratégias de ação [recurso eletrônico]. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 246 p.: il. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/biosseguranca_saude_prioridades_estrategicas_acao.pdf
7. Zhai P, Wang R, Zhou Y, Hu D, Li J, Zhou L. Enhancing the capabilities of biosafety laboratories through the established accreditation system: Development of the biosafety laboratory accreditation system in China. *Journal of Biosafety and Biosecurity*. 2019; 1(2): 86-89. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/sdfe/reader/pii/S2588933818300207/pdf>
 8. Yang JH, Wu UI, Tai HM, Sheng WH. Effectiveness of an ultraviolet-C disinfection system for reduction of healthcare-associated pathogens. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2019; 52(3): 487-493. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118217302001>
 9. Halstead FD, Ahmed Z, Bishop JRB, Oppenheim BA. The potential of visible blue light (405 nm) as a novel decontamination strategy for carbapenemase-producing enterobacteriaceae (CPE). *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2019; 8(14): 1-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13756-019-0470-1>
 10. Tearle J, MacRae G, Andrews S, Clarke A, Stuart J, Tremblay G. Biological Validation and Observations of Formaldehyde Fumigation in Operational and Representative Scenarios in High-Containment Laboratories. *Applied Biosafety: Journal of ABSA International*. 2019; 25(1): 1-7. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1535676019895084>
 11. Vieira R, Santos B, Martins C. Riscos Físicos e Químicos em Laboratório de Análises Clínicas de uma Universidade. *Medicina (Ribeirão Preto Online)*. 2008;41(4):508-515. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/295>
 12. Ueki SYM, Chimara E, Yamauchi JU, Latrilha FO, Simeão FCS, Moniz LL, et al. Monitoramento em cabine de segurança biológica: manipulação de cepas e descon-taminação em um laboratório de micobactérias. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2008; 44(4): 263-269. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S167624442008000400005&script=sci_abstract&tlng=pt
 13. Ueki SYM, Geremias AL, Moniz LL, Latrilha FO, Brito AC, Giampaglia CMS, et al. Cabine de segurança biológica: efeito da luz ultravioleta nas micobactérias. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2006; 65(3): 222-224. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552006000300014&lng=pt&nrm=is_o&tlng=pt
 14. Harrington BJ, Valigosky M. Monitoring Ultraviolet Lamps in Biological Safety Cabinets with Cultures of Standard Bacterial Strains on TSA Blood Agar. *Laboratory Medicine*. 2007; 38(3):165-168. Disponível em: <https://academic.oup.com/labmed/article/38/3/165/2504576>

Autor Correspondente:
Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa
drisierra@hotmail.com

Editor:
Prof. Dr Felipe Villela Gomes

Recebido em: 12/02/2020
Aprovado em: 06/07/2020



Este é um artigo publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Attribution, que permite uso, distribuição e reprodução em qualquer meio, sem restrições, desde que o trabalho original seja corretamente citado.