

KUA
BAC

Centro Pan-Americano de Febre Aftosa

MANUAL DE MÉTODOS

PRODUÇÃO DE VACINA ANTIAFTOSA COM ADJUVANTE OLEOSO LARA-CAMPINAS



1

organização pan-americana da saúde
repartição sanitária pan-americana, escritório regional da
organização mundial da saúde

MANUAL DE MÉTODOS
PRODUÇÃO DE VACINA ANTIAFTOSA COM ADJUVANTE OLEOSO
LARA-CAMPINAS

H.J. Barahona¹, A.C. Gaggero¹, J.A. Mesquita¹

1985

¹Consultores, Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, Caixa Postal 589,
20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

CONTEÚDO

	Pág.
INTRODUÇÃO	7
1. ÁREA CONTAMINADA	9
1.1 LAVAGEM, PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL	9
1.1.1 Material de vidro de uso geral e seringas	9
1.1.2 Pipetas	9
1.1.3 Garrafas-roller	10
1.1.4 Tampas de garrafas-roller	12
1.1.5 Rolhas de borracha	12
1.1.6 Balões com sifão, mangueiras e conjuntos de semeadura e de colheita	12
1.1.7 Balões plásticos não esterilizáveis por calor.	14
1.1.8 Água para lavagem de filtros-Seitz e preparação de inativante	14
1.2 LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO DE LINHAS DE TRANSFERÊNCIA E TANQUES	14
1.2.1 Linhas de meio e transferência de produto entre tanques	14
1.2.2 Lavagem de tanques	17
1.2.3 Esterilização de tanques de cultivo	18
1.2.4 Esterilização do tanque de tratamento por clorofórmio	20
1.2.5 Esterilização do tanque de inativação	21
1.3 MONTAGEM, ESTERILIZAÇÃO E LAVAGEM DE FILTROS-SEITZ	21
1.3.1 Filtro-Seitz ORION - C40	21
1.3.2 Filtro-Setiz ORION pequeno	27
1.3.3 Filtro-Seitz PILOT A-20-Z	29
1.4 FILTRAÇÃO	32
1.4.1 Filtração de meios de crescimento e manutenção. Filtro Orion C40	32
1.4.2 Clarificação do antígeno. Filtro Orion pequeno	36
1.4.3 Filtração de meios de crescimento e manutenção e clarificação de antígeno. Filtro PILOT A-20-Z.	37
1.5 CULTIVO DE CÉLULAS BHK-21 CLONE 13 DE SUSPENSÃO	38
1.5.1 Congelamento e descongelamento de células	38
1.5.2 Esquema de cultivo em balões	40

	Pág.	
1.5.3	Esquema de cultivo em tanques para semear garrafas-roller	43
1.5.4	Esquema de cultivo em tanques para a produção de vírus	46
1.6	CÁLCULOS	47
1.6.1	Contagem de células	47
1.6.2	Cálculos para passagens de células e inoculação de vírus	50
1.7	PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS E VÍRUS SEMENTE	57
1.7.1	Em garrafas-roller	57
1.7.2	Suspensão em tanques	60
1.7.3	Inativação	63
1.7.4	Preparação de vírus-semente	65
1.8	ESQUEMAS SEMANAIS DE PRODUÇÃO	67
1.8.1	Roller somente	68
1.8.2	Tanque somente	69
1.8.3	Roller e tanque	70
1.9	CONTROLES DE PRODUÇÃO	71
1.9.1	Resumo de controles	71
1.9.2	Título infectante	73
1.9.3	Esterilidade	75
1.9.4	Titulação de contaminação do meio pre-filtrado	78
1.9.5	Seqüência de inativação	78
1.9.6	Inocuidade	79
2.	ÁREA LIMPA	82
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	82
2.1.1	Segurança biológica	83
2.1.2	Procedimentos de segurança	83
2.1.3	Lavagem, preparo e esterilização de material	84
2.1.4	Contagem de células cultivadas	87
2.1.5	Parâmetros do crescimento celular	88
2.1.6	Ciclo celular	90
2.1.7	Populações clonais	90
2.1.8	Meios de cultivo para células	93
2.2	USO DE ANTIBIÓTICOS EM CULTIVO CELULAR	96
2.2.1	Penicilina	96

	Pág.	
2.2.2	Estreptomicina	97
2.2.3	Fungizon - Anfotericina B	97
2.2.4	Gentamicina	98
2.2.5	Neomicina	98
2.2.6	Aureomicina	99
2.2.7	Polimixina B	99
2.2.8	Determinação do volume a usar	99
2.3	SORO ANIMAL EM CULTIVOS CELULARES	101
2.3.1	Obtenção de soro bovino	101
2.3.2	Tratamento com PEG	102
2.4	CONTAMINAÇÃO DE CULTIVOS CELULARES COM MICOPLASMAS	104
2.4.1	Efeitos sobre os cultivos celulares	104
2.4.2	Origem e expansão da contaminação	104
2.4.3	Controles	106
2.5	CULTIVOS DE CÉLULAS EM AGAR	107
2.6	PREPARO E COLORAÇÃO DE CROMOSSOMAS	109
2.7	CONGELAMENTO DE CULTIVOS CELULARES	113
2.7.1	Técnica geral de preservação de células por congelamento	115
2.7.2	Recuperação das células	116
2.8	FORMULAÇÃO DE VACINA COM ADJUVANTE OLEOSO	116
2.8.1	Mistura trivalente de antígeno	116
2.8.2	Mistura e filtração do adjuvante oleoso	117
2.8.3	Operação dos emulsificadores de vacina	117
2.8.4	Controles do produto terminado	119
2.9	GLOSSÁRIO DE TERMOS MAIS USADOS	120

INTRODUÇÃO

O presente Manual é um guia prático e de consulta para a produção de vacina antiaftosa com adjuvante oleoso.

Este Manual foi preparado *ad hoc* para o Laboratório Regional de Apoio em Saúde Animal (LARA) do Ministério de Agricultura, Brasil, localizado em Campinas, São Paulo, e faz parte do Convênio de Cooperação Técnica BRA-3205, celebrado entre a Organização Pan-Americana da Saúde/Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (OPAS/CPFA), e o Ministério da Agricultura do Brasil.

Do mesmo modo que o laboratório, também este Manual está dividido em duas áreas:

1. *Área Contaminada* - onde se manipula vírus ativo, produzindo antígeno, inativando-o e controlando sua qualidade; preparado pelo Dr. Horacio Barahona.
2. *Área Limpa* - onde se mantêm os cultivos celulares, produzem-se os meios de cultivo celular e se faz a formulação da vacina com adjuvante oleoso; preparado pelo Dr. Aldo Gaggero e pelo Dr. Julio A. Mesquita.

1. ÁREA CONTAMINADA

1.1 LAVAGEM, PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL

1.1.1 Material de vidro de uso geral e seringas

1.1.1.1 - Todo o material contaminado utilizado no laboratório deve ser submerso em recipientes com uma solução de carbonato a 4% e depois transportado à área de lavagem para seu processamento.

1.1.1.2 - Colocar todo o material de vidro (descontaminado e não contaminado) de molho em recipientes grandes com 1% de detergente EVENTA durante toda a noite.

1.1.1.3 - Escovar bem e enxaguar 5 vezes com água comum em torneira invertida a pressão.

1.1.1.4 - Enxaguar 5 vezes com água desmineralizada em torneira invertida a pressão.

1.1.1.5 - Secar em forno a 150°C durante 30 minutos.

1.1.1.6 - Esfriar e cobrir as bocas com papel de alumínio e papel-Kraft e amarrar com barbante de 8 fios.

1.1.1.7 - Esterilizar em forno a 180°C durante 2 horas.

1.1.1.8 - As seringas hipodérmicas devem ser preparadas da mesma forma, tendo o cuidado de pôr um tubo de hemólise com gase sobre a agulha e embrulhar com papel de alumínio e papel-Kraft.

1.1.2 Pipetas

1.1.2.1 - As pipetas usadas são recebidas em cilindros com uma solução sulfocromica e depois são transportadas para a área de lavagem para seu processamento.

1.1.2.2 - Deixar de molho durante a noite em recipientes com detergente EVENTA a 1%.

1.1.2.3 - Enxaguar individualmente com água comum, usando uma mangueira adaptada à torneira para eliminar os algodões.

1.1.2.4 - Colocar no lavapipetas e enxaguar com água desmineralizada por 10 ciclos.

1.1.2.5 - Secar em forno a 150°C durante 30 minutos.

1.1.2.6 - Esfriar e colocar algodão absorvente no extremo de sucção.

1.1.2.7 - Separar por capacidade e colocar em cilindros de aço inoxidável.

1.1.2.8 - Esterilizar em forno a 180°C durante 2 horas.

1.1.3 Garrafas-roller

Em máquina lavadora

1.1.3.1 - Ligar os três interruptores no quadro elétrico de comando.

1.1.3.2 - Encher os dois tanques de água até completar 200 litros, abrindo parcialmente a torneira superior esquerda de água fria e a torneira sobre o disco de suporte das garrafas.

1.1.3.3 - Fechar a torneira sobre o disco, uma vez obtido o nível adequado de água em ambos tanques.

1.1.3.4 - Adicionar um quilograma de detergente EVENT no tanque esquerdo.

1.1.3.5 - Abrir a torneira superior central de passagem de vapor para aquecer a solução de detergente. Quando a temperatura atingir 80°C, fechar a torneira, abri-la novamente quando chegue a 70°C e continuar desta forma para manter a temperatura entre 70-80°C durante toda a lavagem.

1.1.3.6 - Abrir a torneira superior esquerda da água do primeiro enxágüe com água comum.

1.1.3.7 - Fazer funcionar o disco suporte das garrafas acionando à esquerda a alavanca para ligar o motor Nº 1. ANTES DE INICIAR ESTA TAREFA, CERTIFIQUE-SE QUE O DISCO SUPORTE FIQUE PARA A DIREITA, O MÁXIMO POSSÍVEL, EVITANDO ASSIM A DESTRUIÇÃO DAS ENGRENAGENS DA MÁQUINA.

1.1.3.8 - Ligar as bombas da solução de detergente e da água para enxaguar, movendo as alavancas dos motores Nº 2 e 3 para a direita e depois para a esquerda.

1.1.3.9 - Abrir a torneira lateral para dar passagem à água desmineralizada.

1.1.3.10 - Iniciar a lavagem colocando as garrafas no disco suporte, tendo o cuidado de marcar o lugar de início para evitar que as garrafas sejam lavadas mais de uma vez ou fiquem sem lavar.

1.1.3.11 - Colocar as garrafas lavadas na mesa de drenagem.

1.1.3.12 - Uma vez terminada a lavagem, desligam-se os motores na máquina e no quadro de comando, fecham-se as torneiras de água corrente, desmineralizada e de vapor, e se elimina a água dos tanques, tendo o cuidado de limpá-los bem com água corrente, assim como os ralos de retenção de resíduos.

1.1.3.13 - Limpar e secar a parte externa da máquina.

Lavagem manual

1.1.3.14 - Seguem-se as mesmas instruções da lavagem do material de vidro de uso geral indicadas no ponto 1.1.1.

Preparo e esterilização

1.1.3.15 - Colocar o papel de alumínio na boca das garrafas.

1.1.3.16 - Esterilizar em forno a 180°C durante 2 horas.

1.1.3.17 - Retirar do forno e colocar em cestas-roller.

1.1.4 Tampas de garrafas-roller

1.1.4.1 - Deixar as tampas novas em detergente EVENT a 2% durante 48 horas.

1.1.4.2 - As tampas usadas devem ficar de molho no detergente EVENT a 1% durante a noite.

1.1.4.3 - Enxaguar bem com água corrente.

1.1.4.4 - Enxaguar 5 vezes com água desmineralizada.

1.1.4.5 - Secar a temperatura ambiente ou a 37°C.

1.1.4.6 - Colocar em camadas separadas por gase em marmitas de alumínio de 8-10 litros.

1.1.4.7 - Tampar e embrulhar com papel-Kraft e barbante.

1.1.4.8 - Esterilizar em autoclave a 121°C/15 lb durante 60 minutos.

1.1.5 Rolhas de borracha

1.1.5.1 - Colocar as rolhas novas em detergente a 2% durante 1 semana.

1.1.5.2 - Colocar as rolhas usadas em detergente a 1% durante 24 horas.

1.1.5.3 - Enxaguar bem com água corrente.

1.1.5.4 - Enxaguar 5 vezes com água desmineralizada.

1.1.5.5 - Secar a temperatura ambiente ou a 37°C.

1.1.5.6 - As rolhas menores colocam-se em frascos e as grandes se embrulham individualmente com papel de alumínio e papel-Kraft para a sua esterilização.

1.1.6 Balões com sifão, mangueiras e conjuntos de semente e de colheita

1.1.6.1 - Retirar os sifões dos balões, frascos Erlenmeyer, etc., para ser lavados separadamente.

1.1.6.2 - Deixar os frascos de molho durante a noite numa solução a 1% de detergente EVENT.

1.1.6.3 - Retirar os filtros dos sifões e pôr estes últimos num recipiente com detergente durante a noite. Os filtros não devem ser molhados.

1.1.6.4 - Fazer o mesmo com as mangueiras de transferência, com ou sem conexão, com os funís de semeadura ou inoculação, os funís de colheita e as mangueiras-tampa-sifão.

1.1.6.5 - Lavar bem com água corrente as partes interna e externa dos sifões e outras mangueiras.

1.1.6.6 - Enxaguar da mesma forma com água desmineralizada.

1.1.6.7 - Pendurar para escorrer a água e secar.

1.1.6.8 - Instalar os sifões nos balões, ligar os filtros e as mangueiras-tampa-sifão, cobrir o conjunto com papel de alumínio e papel-Kraft e finalmente amarrar com barbante.

1.1.6.9 - Tamponar os extremos das mangueiras com gase e cobrir com papel de alumínio, embrulhar toda a mangueira com papel-Kraft e amarrar com barbante. Os funís de semeadura e colheita cobrem-se nos extremos com papel de alumínio e se embrulham com papel-Kraft.

1.1.6.10 - As mangueiras-tampa-sifão soltas tamponam-se com gase no extremo livre, cobrem-se com papel de alumínio e se embrulham em pacotes de 5 amarrados com barbante.

1.1.6.11 - Os filtros de sifão cobrem-se nos seus extremos com papel de alumínio e se embrulham individualmente com papel-Kraft.

1.1.6.12 - As bocas dos funís de colheita cobrem-se com papel de alumínio, ligam-se ao tanque de distribuição para a bomba peristáltica, e todo o conjunto se embrulha em papel-Kraft e se amarra com barbante.

1.1.6.13 - Esterilizar todos os materiais em autoclave a 121°C/15 lb, durante 50 minutos.

1.1.7 Balões plásticos não esterilizáveis por calor

1.1.7.1 - Lavar e enxaguar da mesma forma que o material de vidro de uso geral.

1.1.7.2 - Adicionar 1/2 litro de clorofórmio ao primeiro balão, enxaguar e transferir para os balões seguintes, repetindo a mesma operação.

1.1.7.3 - Adicionar 2 litros de formol a 1% em água destilada estéril a cada balão, enxaguar bem e, para facilitar a formação de vapores, deixar durante 24 horas a uma temperatura ambiente de 25-37°C.

1.1.7.4 - Eliminar o formol e tampá-los com tampas previamente esterilizadas em autoclave.

1.1.7.5 - Guardá-los até ser usados.

NOTA: Estes balões usam-se somente para guardar o antígeno inativado.

1.1.8 Água para lavagem de filtros-Seitz e preparação de inativante

1.1.8.1 - Pôr 15 litros de H₂O desmineralizada em balões de 20 litros com sifão e 1,5 litros em garrafas-roller com tampas soltas.

1.1.8.2 - Esterilizar em autoclave a 121°C/15 lb durante 60 minutos.

1.1.8.3 - Retirar do autoclave e deixar esfriar a temperatura ambiente.

1.1.8.4 - Conservar a água para a lavagem de filtros em câmara fria a 4°C e a água para o preparo do inativante em estufa a 37°C.

1.2 LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO DE LINHAS DE TRANSFERÊNCIA E TANQUES

1.2.1 Linhas de meio e transferência de produto entre tanques

As linhas de meio e transferência possuem sistemas independentes de entrada de vapor e de filtro-domnick para compensar o vácuo durante o esfriamento ou para esfriá-las rapidamente mediante a passagem de ar comprimido estéril.

Estas linhas devem ser esterilizadas em toda a sua extensão e somente antes de ser usadas, tendo o cuidado de nunca esterilizá-las de um dia para o outro.

Linha de meio

1.2.1.1 - Esta linha tem uma entrada de meio filtrado, linhas de acesso a cada um dos tanques de cultivo e uma saída final para alimentar um tanque móvel.

1.2.1.2 - Certificar-se de que o registro de entrada de ar comprimido ao filtro-domnick esteja completamente fechado.

1.2.1.3 - Abrir o registro de entrada à linha e o de entrada de vapor à mesma, para deixar sair a água condensada. Fechar quando somente saia vapor.

1.2.1.4 - Abrir parcialmente todas as tampas de entrada e saída de cada tanque e de saída para o tanque móvel.

1.2.1.5 - Abrir totalmente todos os registros ao longo da linha e os de entrada aos tanques, tendo o cuidado de fechar completamente os de acesso direto aos mesmos.

1.2.1.6 - Abrir totalmente o registro da linha ao filtro-domnick e parcialmente o de saída do mesmo ao exterior.

1.2.1.7 - Abrir completamente todos os registros de entrada e saída da linha.

1.2.1.8 - Abrir completamente a passagem de vapor e deixar fluir por 60 minutos.

1.2.1.9 - Fechar a passagem de vapor e todas as tampas de saída e entrada, menos a do registro de saída do filtro-domnick que deverá permanecer aberto até que escape o vapor residual.

1.2.1.10 - Quando a pressão de vapor baixe, fechar completamente o registro de saída do filtro-domnick e abrir a passagem de ar comprimido para o mesmo e para a linha, de forma que esta última fique com pressão positiva até que seja usada (pressão de 10 lb).

1.2.1.11 - Como alternativa, para o uso rápido da linha, podem-se deixar parcialmente abertas todas as tampas de entrada e saída, deixando fluir ar comprimido através do filtro-domnick durante 10-15 minutos. Uma vez esfriada, fecham-se todas as tampas e a passagem de ar.

1.2.1.12 - Eliminar a pressão da linha fechando a passagem de ar comprimido e abrindo o registro de saída do filtro-domnick.

1.2.1.13 - Fechar todos os registros da linha, menos os de entrada ao tanque que receberá o meio.

1.2.1.14 - Fechar o registros da linha ao filtro-domnick.

1.2.1.15 - Ligar em forma estéril a mangueira de transferência desde o filtro até a entrada da linha.

1.2.1.16 - Abrir o registro de entrada à linha e o de entrada direta ao tanque receptor.

1.2.1.17 - Proceder à filtração.

1.2.1.18 - Uma vez finalizada a filtração, desligar a mangueira, abrir completamente todos os registros, tirar todas as tampas de saída e lavar bem com vapor ou água corrente.

Linha de transferência do produto

1.2.1.19 - Esta linha tem duas saídas em ambos extremos da sala de tanques, ligações individuais à saída inferior de cada tanque de cultivo e um terminal no tanque de tratamento por clorofórmio.

1.2.1.20 - Usa-se esta linha para a transferência de meio e de células entre os tanques e para passar antígeno de suspensão ao tanque de tratamento por clorofórmio.

1.2.1.21 - A esterilização desta linha é basicamente a mesma usada para a da linha de meio. Cada vez que seja usada, a linha deve ser esterilizada em toda a sua extensão.

Linhas de transferência de produtos do tanque de tratamento ao tanque de inativação e deste para a área limpa

1.2.1.22 - Estas linhas são independentes e podem ser esterilizadas em conjunto ou separadamente pois possuem uma fonte comum de vapor, com registros independentes e um filtro-domnick comum às duas linhas para compensar o vácuo, também com registros separados. O filtro-domnick recebe uma linha de ar comprimido para manter a pressão positiva durante o esfriamento.

1.2.1.23 - Devem ser esterilizadas de acordo com os mesmos princípios básicos indicados para as linhas de meio e de transferência de produto.

1.2.2 Lavagem de tanques

Materiais

1.2.2.1 - Água corrente.

1.2.2.2 - Água desmineralizada.

1.2.2.3 - Sabão de coco.

1.2.2.4 - Esponja grande.

1.2.2.5 - Escova grande com cabo comprido.

Procedimento

1.2.2.6 - Abrir todas as saídas e entradas do tanque e fechar os registros de entrada aos filtros-domnick ao finalizar o cultivo.

1.2.2.7 - Fechar bem os registros de circulação de água a 37°C e 4°C da camisa.

1.2.2.8 - Retornar a água a 4°C ao sistema de esfriamento e eliminar a água a 37°C, dependendo do sistema que esteja em uso.

1.2.2.9 - Enxaguar com água corrente o interior do tanque e passar água diretamente pelos canos de entrada de meio e outras entradas e saídas.

1.2.2.10 - Limpar bem o interior do tanque com sabão*, esponja e escova.

1.2.2.11 - Enxaguar bem com água corrente, tendo o cuidado de passar a água diretamente pelos canos de entrada de meio e outras entradas e saídas.

1.2.2.12 - Enxaguar cuidadosamente com água desmineralizada.

1.2.3 Esterilização de tanques de cultivo

Procedimento

1.2.3.1 - Certificar-se de que os registros de circulação de água a 4°C e 37°C para a camisa estejam bem fechados.

1.2.3.2 - Certificar-se de que a camisa do tanque esteja vazia e os registros superiores e inferiores da mesma abertos, para evitar acidentes por excesso de pressão.

1.2.3.3 - Mudar a rolha de borracha para a colheita de amostra.

1.2.3.4 - Fechar hermeticamente a tampa de observação.

1.2.3.5 - Certificar-se que os registros de entrada de ar comprimido para os filtros-domnick estejam fechados.

1.2.3.6 - Certificar-se que os registros de entrada ao tanque das linhas de meio e transferência estejam fechados, tendo o cuidado de deixar abertas as saídas inferiores do tanque.

1.2.3.7 - Colocar as tampas de entrada de vírus, linha de meio, lateral inferior e as duas inferiores, tendo o cuidado de que todas fiquem soltas.

1.2.3.8 - Abrir completamente todos os registros de entrada e saída do tanque.

1.2.3.9 - Abrir parcialmente os registros de entrada de vapor ao tanque (direto, através da entrada de vírus e através do filtro-

*NOTA: Recomenda-se não usar EVENT ou outro detergente.

domnick de entrada) e deixar fluir o vapor a pressão baixa durante 15 minutos, para o pre-aquecimento e eliminação do condensado.

1.2.3.10 - Fechar a entrada de vapor pelos dois registros secundários (vírus e domnick) e aumentar a entrada (pressão) de vapor pelo registro direto.

1.2.3.11 - Fechar parcialmente as saídas de vapor dos 2 filtros-domnick superiores do tanque.

1.2.3.12 - Regular o fluxo de entrada e saída de vapor ao tanque com o registro principal de vapor e com os 3 registros mencionados no ponto 1.2.3.11.

1.2.3.13 - Ajustar a temperatura 121-124°C, com uma pressão de 15-20 lb, deixando durante 60 minutos para obter uma boa esterilização.

1.2.3.14 - Vigiar continuamente para evitar baixas ou aumentos de pressão e temperatura.

1.2.3.15 - Ao finalizar a esterilização proceder da seguinte forma:

- a) fechar o registro principal de entrada de vapor;
- b) fechar o registro ao exterior do filtro-domnick de entrada;
- c) fechar hermeticamente a tampa e a contra-tampa da entrada de vírus;
- d) abrir completamente o registro do manômetro de pressão;
- e) fechar o registro de saída superior do tanque;
- f) abrir parcialmente o registro de saída do domnick de saída;
- g) fechar a tampa e o registro da linha de meio e a saída lateral inferior;
- h) fechar a tampa e os registros das duas saídas inferiores.

1.2.3.16 - Abrir a entrada de ar comprimido do filtro-domnick de entrada e regular o fluxo de saída do domnick de saída para manter uma

pressão positiva de 5-10 lb dentro do tanque, o que permitirá um rápido esfriamento do mesmo.

1.2.3.17 - Quando a temperatura atingir 60-70°C, fechar o domínio de saída, deixar que a pressão chegue a + 22 lb e fechar a entrada de ar comprimido. O tanque deve ficar com pressão positiva até seu uso.

1.2.3.18 - Caso se deseje esfriar mais rapidamente o tanque, pode-se circular água corrente pela camisa, uma vez que se chegue ao ponto 1.2.3.17.

1.2.3.19 - É muito comum esterilizar um tanque conjuntamente com a linha de meio ou de transferência. Para isto, deixa-se aberto o registro de entrada do tanque à linha a ser esterilizada e fecha-se ao final da operação, continuando a seguir de acordo com as instruções de fim de esterilização da linha e do tanque.

1.2.4 Esterilização do tanque de tratamento por clorofórmio

1.2.4.1 - O tanque de tratamento por clorofórmio difere dos tanques de cultivo no seguinte:

- a) não tem sistema de aquecimento a 37°C na camisa;
- b) não tem entrada lateral superior de meio;
- c) não tem saída lateral inferior;
- d) somente tem uma entrada de vapor;
- e) a saída de sobrenadante se comunica com o exterior e com a linha de transferência ao tanque de inativação. Esta comunicação é direta, através de um registro na linha e indireta, por um registro ao exterior.

1.2.4.2 - Considerando as diferenças mencionadas, devem-se seguir as mesmas normas básicas de esterilização indicadas para os tanques de cultivo.

1.2.5 Esterilização do tanque de inativação

1.2.5.1 - O tanque de inativação difere do tanque de tratamento no seguinte:

- a) tem sistema de aquecimento a 37°C na camisa;
- b) somente tem uma entrada de vapor;
- c) a entrada superior está adaptada para a passagem de vírus filtrado e para a entrada do inativante;
- d) a entrada de transferência comunica-se com a saída de sobrenadante do tanque de tratamento por clorofórmio;
- e) a saída do sobrenadante comunica-se com a linha de transferência à área limpa.

1.2.5.2 - Seguem-se as mesmas normas de esterilização indicadas para o tanque de tratamento e os tanques de cultivo.

1.3 MONTAGEM, ESTERILIZAÇÃO E LAVAGEM DE FILTROS-SEITZ

1.3.1 Filtro-Seitz ORION - C40

Montagem

- Dupla filtração com câmara de inversão:

1.3.1.1 - Usa-se a dupla filtração para clarificar e esterilizar o meio utilizando, no nosso caso, placas K2 e EKS1, respectivamente.

1.3.1.2 - As entradas, saídas e purgadores do filtro orientam-se de acordo com a Figura 1.

1.3.1.3 - A orientação das placas filtrantes e o esquema de fluxo estão indicados na Figura 2.

1.3.1.4 - As placas filtrantes devem ser instaladas com o lado rugoso virado para onde entra o líquido e o lado liso (com a marca Seitz estampada) virado para o sentido do fluxo.

1.3.1.5 - Para filtrar meio de crescimento usa-se uma placa EKS1 cada 18 litros a ser filtrados e uma placa K2 cada duas placas EKS1.

FIGURA 1. Filtro Seitz Orion C-40 Dupla Filtração

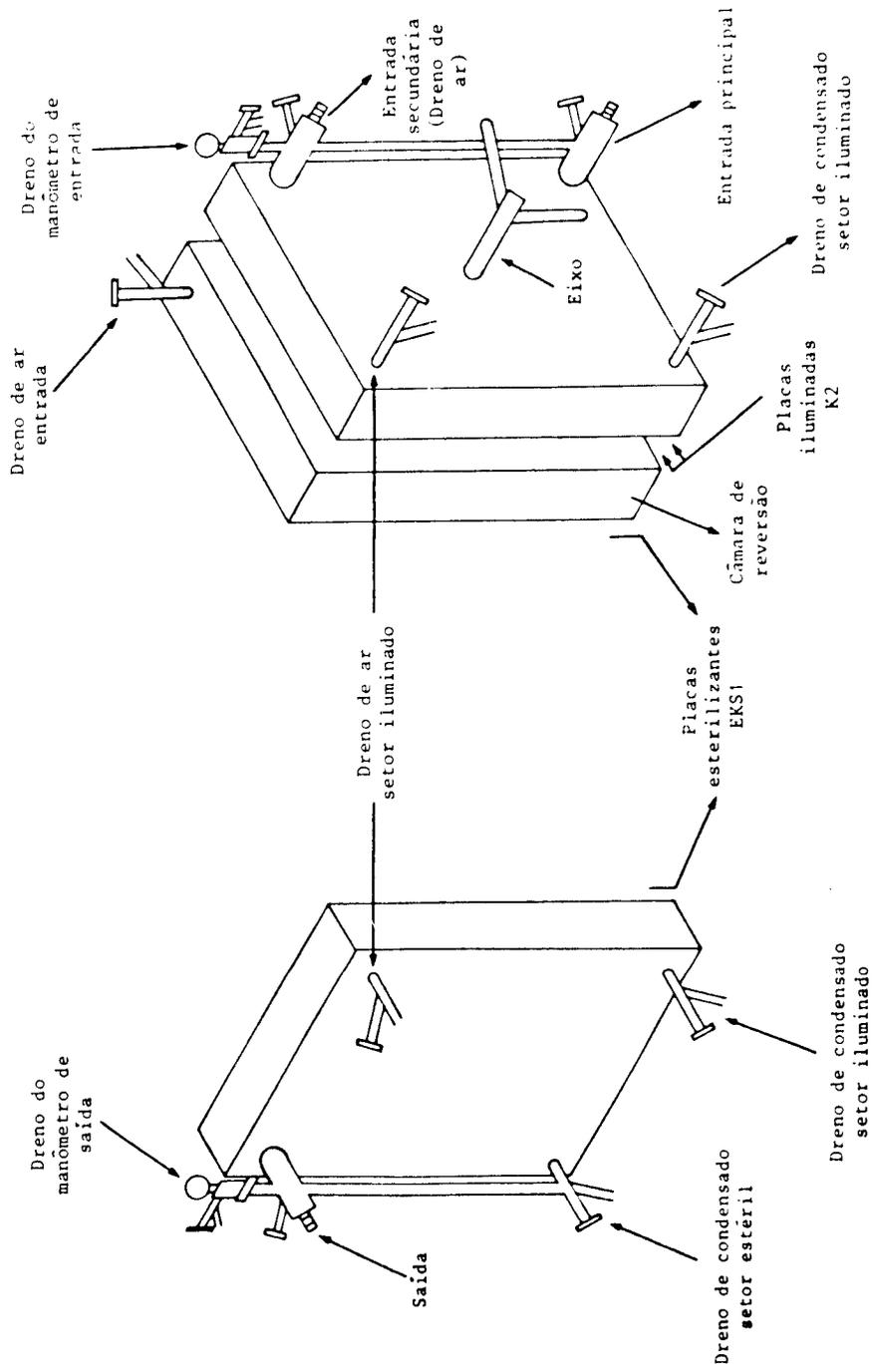
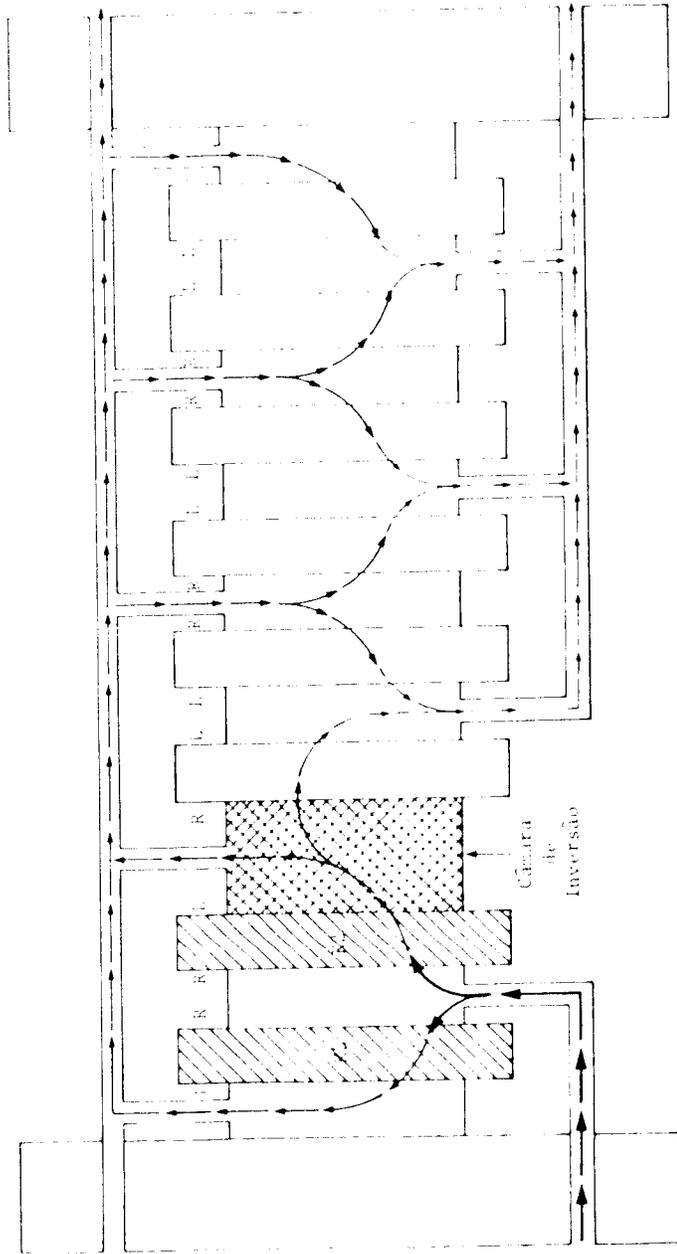


FIGURA 1. Filtrador de placa estampada



 Sem filtrar
 Limpiado
 Filtrado

L = Parte lisa da placa, com marca estampada
 R = Parte rugosa da placa

1.3.1.6 - Para filtrar meio de manutenção usa-se uma placa EK51 para cada 28 litros a serem filtrados e uma placa K2 para cada duas placas EK51.

- Filtração simples:

1.3.1.7 - Usa-se a filtração simples para clarificar ou esterilizar antígenos ou meios, utilizando no nosso caso, placas K2 e EK51, respectivamente.

1.3.1.8 - As entradas, saídas e purgadores do filtro orientam-se de acordo com a Figura 3.

1.3.1.9 - A orientação das placas filtrantes e o esquema de fluxo estão indicados na Figura 4.

1.3.1.10 - Seguir as mesmas instruções indicadas nos pontos 1.3.1.4 a 1.3.1.6 da dupla filtração.

Esterilização:

1.3.1.11 - Uma vez instaladas as placas, aperta-se levemente o eixo da prensa até que as placas se juntem.

1.3.1.12 - Todos os purgadores, entradas e saídas devem ser instalados com mangueiras com pinças de pressão regulável e os registros devem ficar parcialmente abertos.

1.3.1.13 - Ligar a mangueira de vapor à entrada principal da torneira e abrir completamente o registro correspondente.

1.3.1.14 - Abrir parcialmente o registro de entrada de vapor e deixar fluir o vapor a baixa pressão durante 20-30 minutos, tendo o cuidado de que saia vapor e/ou condensado por todos os registros. Isto permitirá o pre-aquecimento do filtro e a não acumulação do condensado.

1.3.1.15 - Regular o fluxo de vapor para manter 1,4-1,5 kg/cm² de pressão (121°C) durante 60 minutos.

1.3.1.16 - Desligar o vapor.

Figura 1. Filtración con Filtros Simple

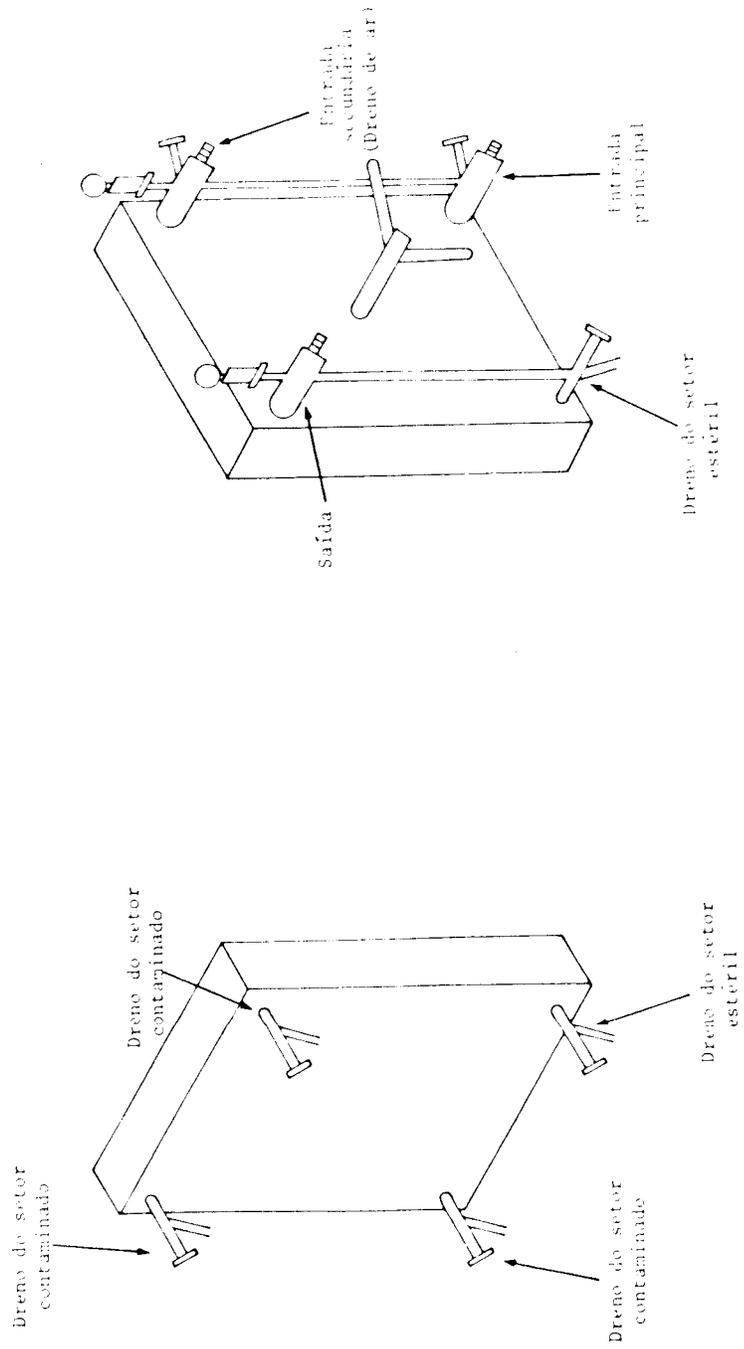
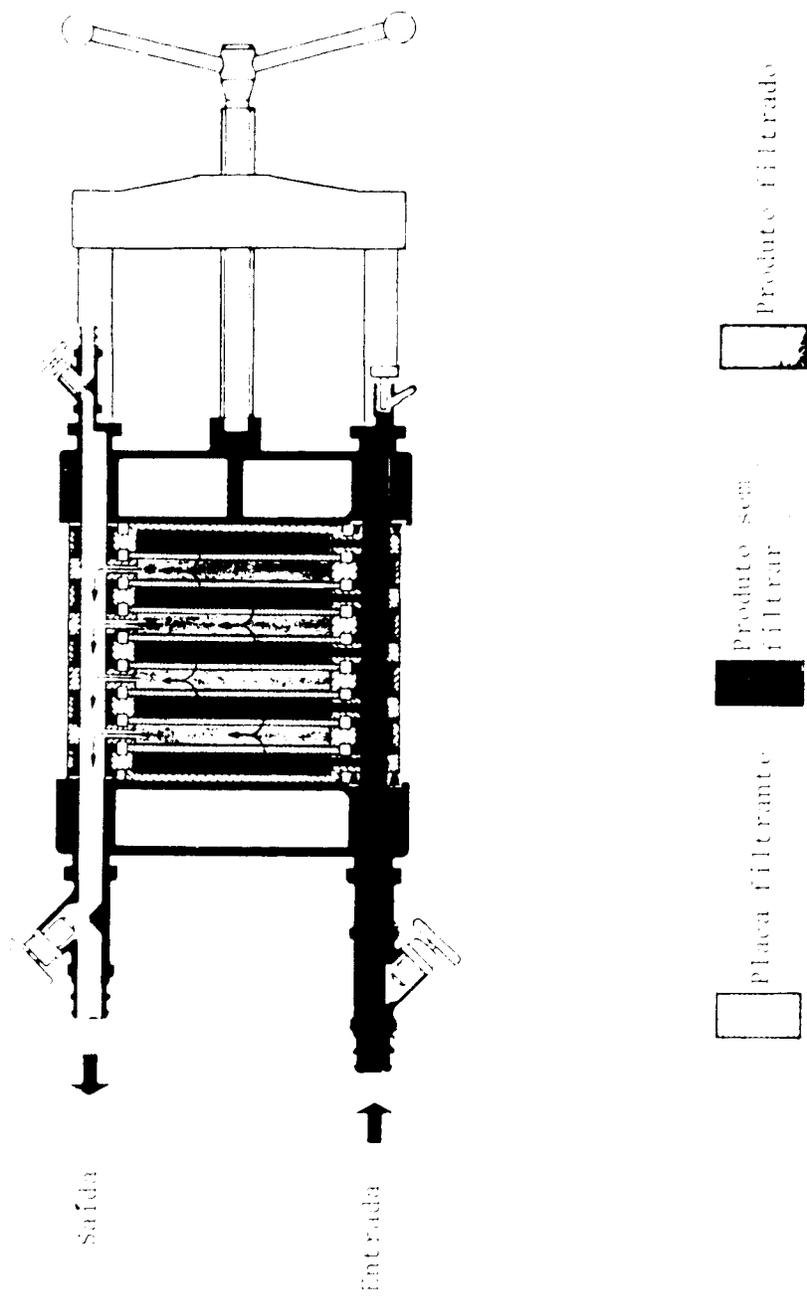


FIGURA 1. Filtro Saite Orion C-40 Filtração Sólida



1.3.1.17 - Colocar filtros de sifão em todas as mangueiras e fechar todos os registros, menos os de entrada e drenos do setor contaminado, para compensar a pressão interna do filtro durante o esfriamento.

1.3.1.18 - Apertar bem o eixo e deixar esfriar.

1.3.1.19 - Pode-se acelerar o processo de esfriamento mediante a passagem de água desmineralizada de lavagem (ver filtração de meio).

1.3.1.20 - Esterilizar o filtro no dia de seu uso.

Lavagem

1.3.1.21 - O filtro é desmontado depois de usado e deverá observar-se se as placas filtrantes estão intactas.

1.3.1.22 - Enxaguar com água corrente as placas metálicas, os registros, os ductos e a estrutura em geral.

1.3.1.23 - Lavar com sabão de coco, esponja e escova suave, para remover os restos de placas filtrantes que fiquem aderidos às placas metálicas. NÃO USAR RASPADORES METÁLICOS NEM BOM-BRIL.

1.3.1.24 - Engraxar periodicamente o eixo.

1.3.2 Filtro-Seitz ORION pequeno

Montagem

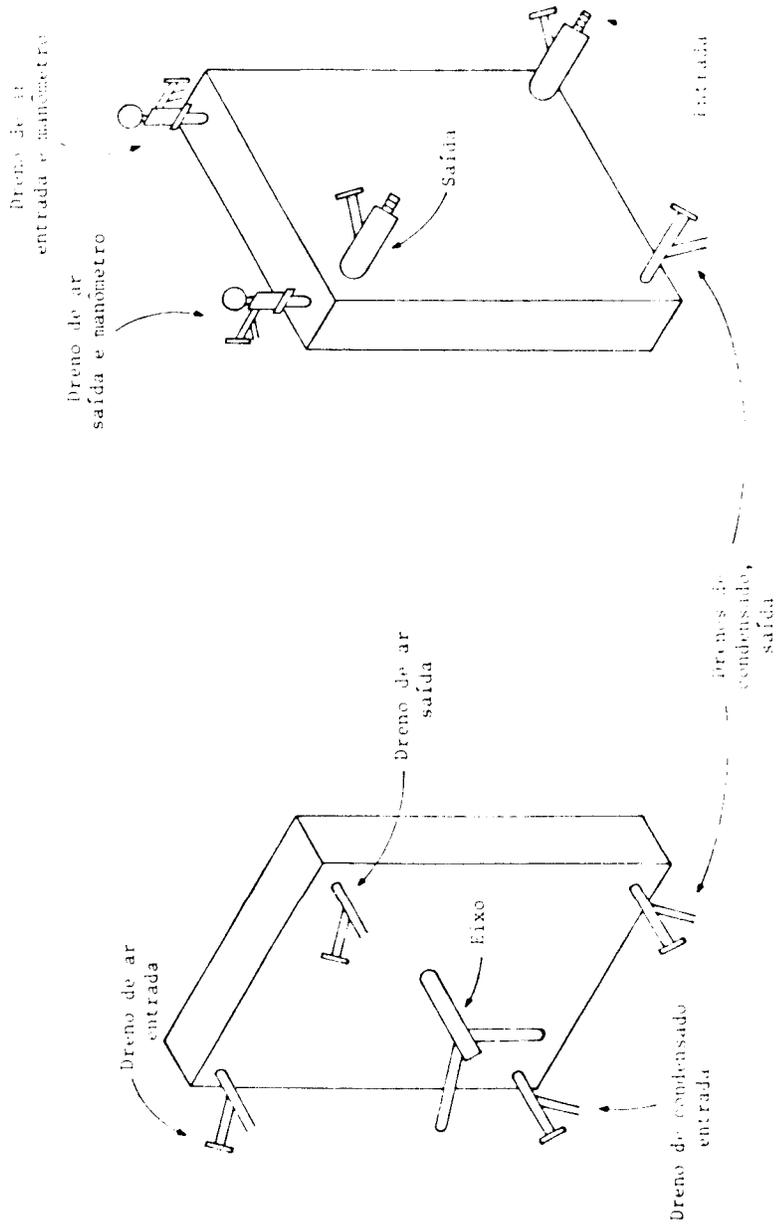
1.3.2.1 - Este filtro não tem câmara de inversão e, portanto, usa-se principalmente para clarificar antígeno do tanque de tratamento ao tanque de inativação. Monta-se com placas K2.

1.3.2.2 - As entradas, saídas e drenos do filtro orientam-se de acordo com a Figura 5.

1.3.2.3 - A orientação das placas filtrantes e o esquema de fluxo estão indicados na Figura 4 do filtro Orion C40.

1.3.2.4 - Este filtro aceita no máximo de 9 placas filtrantes, as quais devem ser instaladas com o lado rugoso virado para onde entra

FIGURA 5. Filtro Seitz Orion 0-40 Pequeno.



o líquido e o lado liso (com a marca Seitz estampada) virado para onde sai o líquido.

1.3.2.5 - Para clarificar antígeno usa-se uma placa K2 para cada 40 litros a serem filtrados.

Esterilização e lavagem

1.2.3.6 - Seguir as mesmas instruções indicadas para o filtro Orion C40.

1.3.3 Filtro-Seitz PILOT A-20-Z

Preparação

- Dupla filtração com câmara de inversão

1.3.3.1 - Usa-se a dupla filtração para clarificar e esterilizar meio utilizando, no nosso caso, placas K2 e EKS1, respectivamente.

1.3.3.2 - As entradas, saídas e drenos do filtro orientam-se de acordo com a Figura 6.

1.3.3.3 - A orientação das placas filtrantes e o esquema de fluxo estão indicados nas Figura 7.

1.3.3.4 - As placas filtrantes devem ser instaladas com o lado rugoso virado para a entrada do líquido e o lado liso (com a marca Seitz estampada) virado para a saída do líquido.

1.3.3.5 - Para filtrar meio de crescimento usa-se uma placa EKS1 para cada 4,5 litros a ser filtrados e uma placa K2 para cada duas placas EKS1.

1.3.3.6 - Para filtrar meio de manutenção usa-se uma placa EKS1 para cada 7 litros e uma placa K2 para cada duas placas.

- Filtração simples

1.3.3.7 - A filtração simples usa-se para clarificar ou esterilizar antígenos ou meios utilizando, neste caso, placas K2 e EKS1, respectivamente.

FIGURA 6. Filtro Seitz Pilot A-20-2 Filtração Imp.

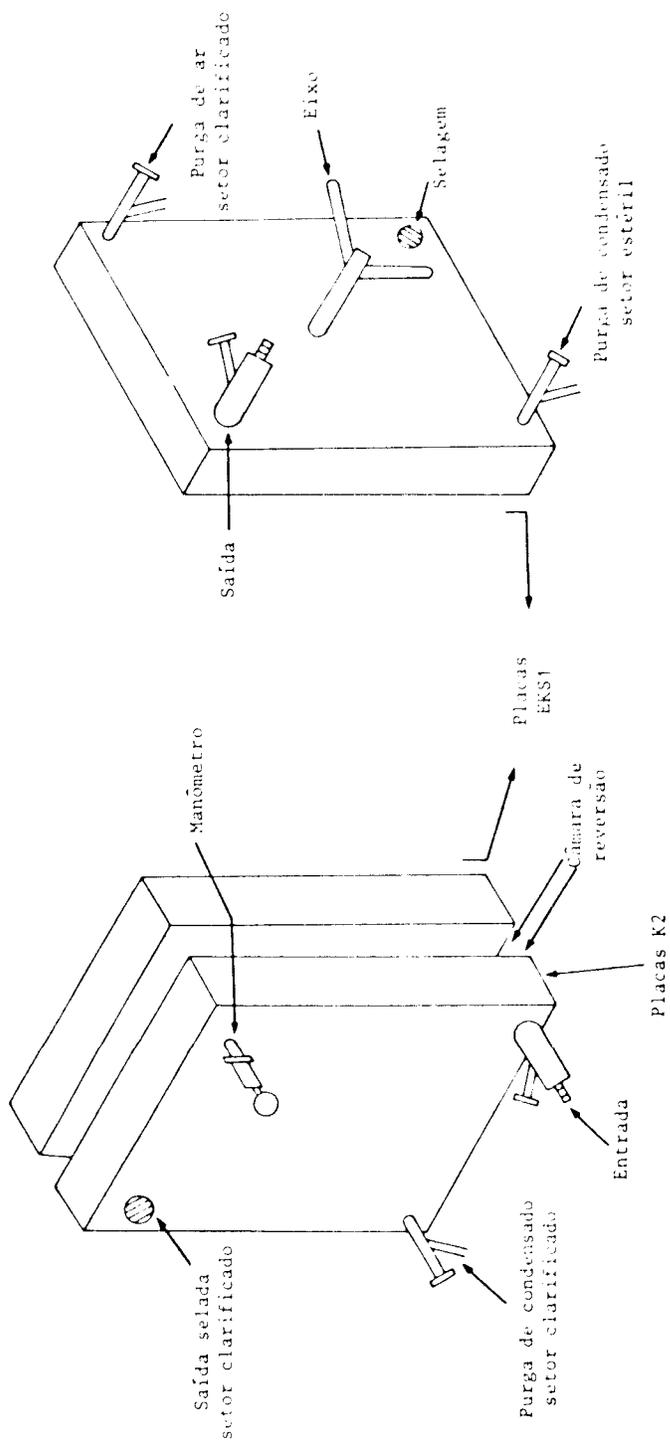
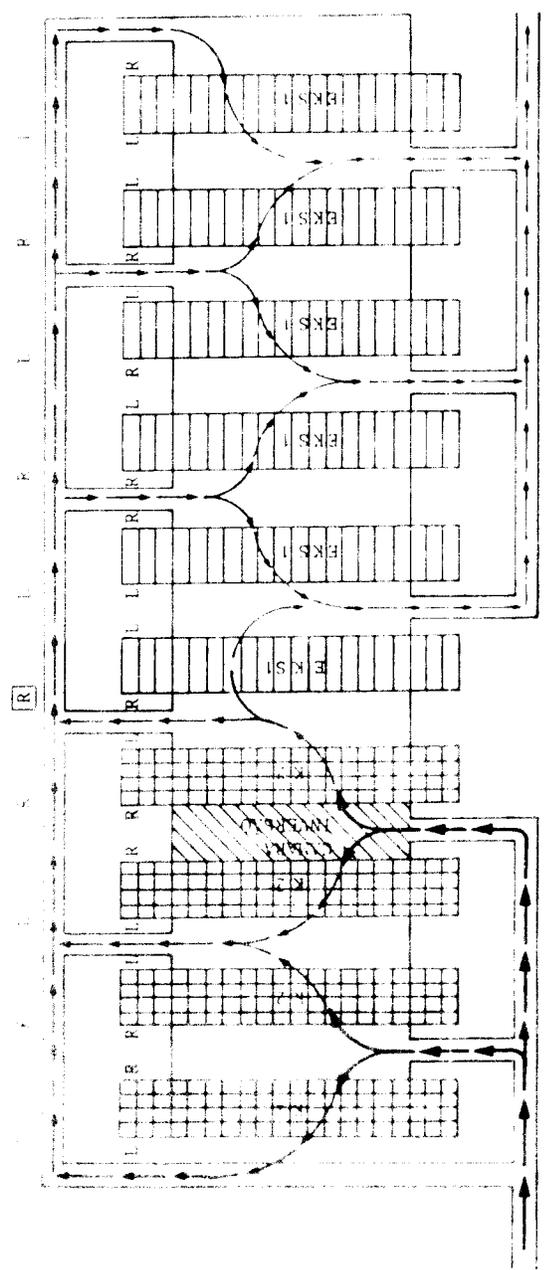


FIGURE 1. Schematic diagram of a wastewater treatment plant showing the flow of water through various stages of treatment.



1.3.3.8 - As entradas, saídas e drenos do filtro orientam-se de acordo com a Figura 8.

1.3.3.9 - A orientação das placas filtrantes e o esquema de fluxo estão indicados na Figura 9.

1.3.3.10 - Seguir as mesmas instruções dos pontos 1.3.3.4 a 1.3.3.6 da dupla filtração.

Instalação e lavagem

1.3.3.11 - Seguir as mesmas instruções indicadas para o filtro Orion C40.

1.4 FILTRAÇÃO

1.4.1 Filtração de meios de crescimento e manutenção. Filtro Orion C40

Materiais

1.4.1.1 - Filtro montado e esterilizado de acordo com o tipo e quantidade de meio que se deseje filtrar.

1.4.1.2 - Meio preparado na área limpa. Deve-se sempre preparar 20-30 litros acima da quantidade necessária devido à perda na filtração além do que fica no filtro ao finalizar a operação.

1.4.1.3 - Mangueira de conexão do cano do meio ao filtro.

1.4.1.4 - Mangueira de conexão do filtro à linha de meio, com saídas múltiplas para colher amostras e para balões de 20 litros.

1.4.1.5 - Erlenmeyer com sifão para colher amostra filtrada.

1.4.1.6 - Erlenmeyer simples.

1.4.1.7 - Balões com 60 litros de água desmineralizada estéril.

1.4.1.8 - Bomba de pressão.

1.4.1.9 - Mangueira múltipla para conexão de balões ao filtro.

1.4.1.10 - Pinças de mangueiras, de pressão regulável.

FIGURA 8. Filtro Seitz Pilot A-20-Z Filtração Simples

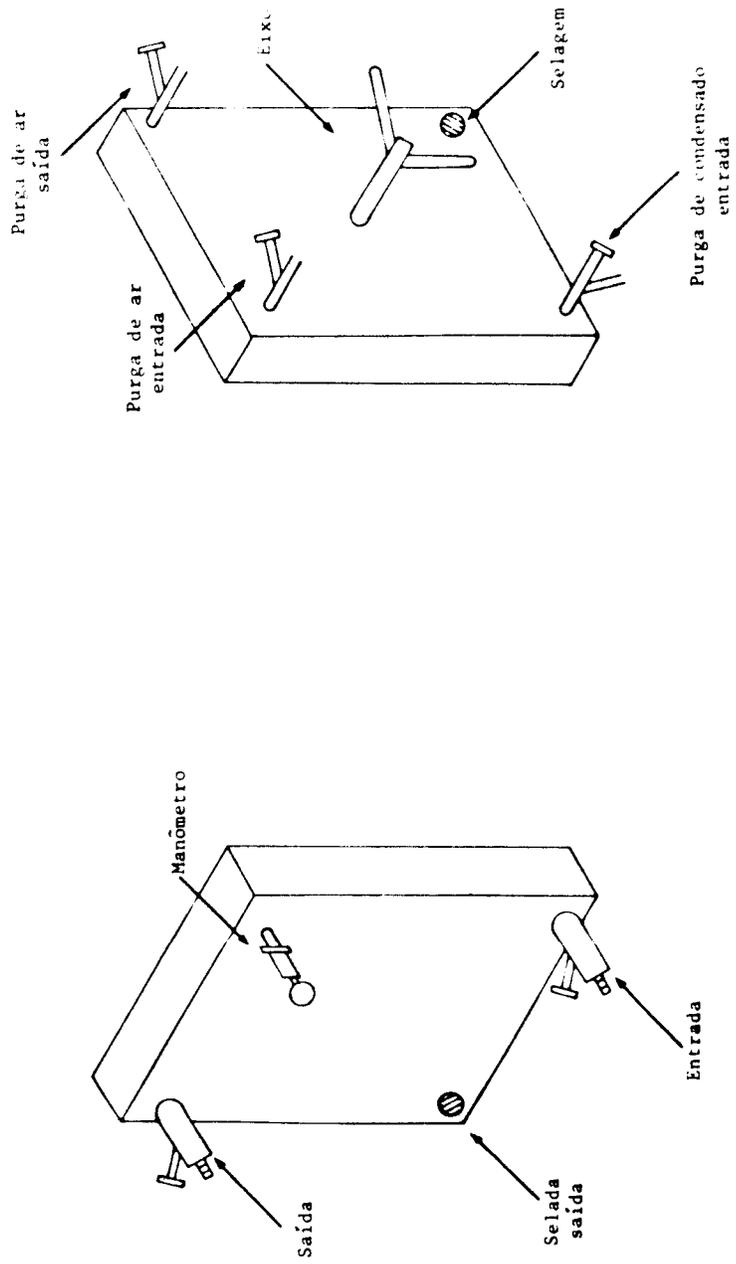
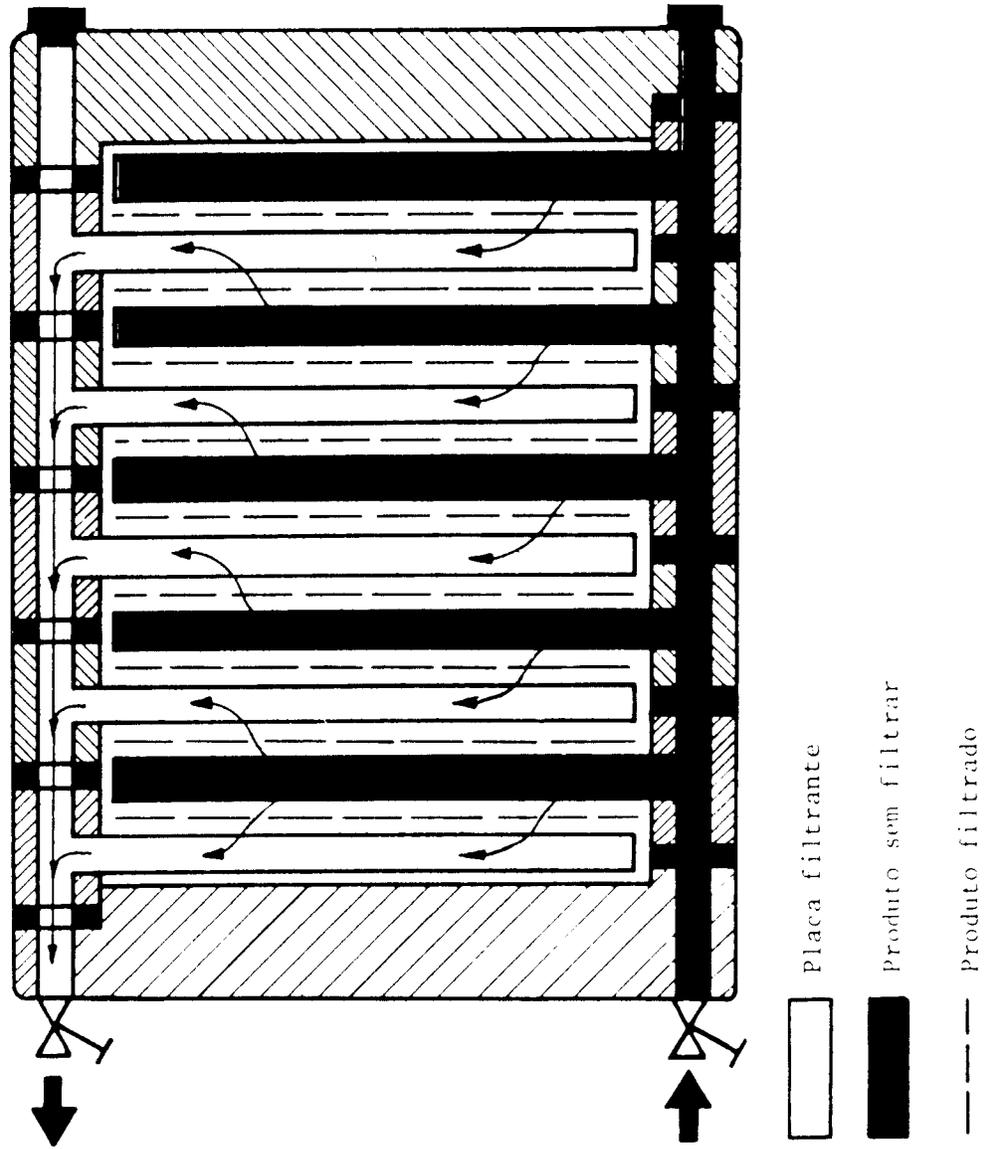


FIGURA 9. Filtro Seitz Filtração Simples



1.4.1.11 - Linha de meio estéril com pressão positiva.

Procedimento

1.4.1.12 - Ligar a mangueira múltipla da saída do filtro à entrada da linha de meio, tendo o cuidado de colocar pinças em todas as saídas para balões e na principal depois da primeira saída que ficará como drenagem.

1.4.1.13 - Colocar pinças em todas as outras mangueiras, menos na da entrada principal e eliminar os filtros de sifão.

1.4.1.14 - Ligar a segunda mangueira múltipla aos sifões dos balões com água estéril, tendo o cuidado de colocar pinças em todas as conexões. Ligar o outro extremo à entrada principal do filtro.

1.4.1.15 - Fechar todas as entradas e saídas do filtro menos a entrada principal que deve ficar totalmente aberta.

1.4.1.16 - Ligar a bomba aos filtros dos sifões e passar a água para o filtro Orion, tendo o cuidado de soltar sequencialmente as pinças das mangueiras dos balões à medida que a água esgotar.

1.4.1.17 - Abrir e fechar os drenos sucessivamente à medida que a água chegue a cada um deles. A sequência a seguir é a seguinte:

- a) entrada secundária;
- b) dreno do manômetro de entrada;
- c) dreno da placa de inversão;
- d) dreno de condensado do setor clarificado;
- e) drenos de ar do setor clarificado;
- f) dreno de condensado do setor estéril;
- g) dreno do manômetro de saída;
- h) primeira saída da mangueira múltipla.

1.4.1.18 - Drenar a saída do tanque de preparação de meio e

colher amostra para controlar a carga bacteriana e o pH. O controle não deve dar um título superior a 10^7 bact./ml e um pH de 7,6.

1.4.1.19 - Retirar a mangueira de água da entrada principal e ligar a mangueira de meio a esta e à saída do tanque de preparação.

1.4.1.20 - Iniciar a passagem de meio com uma pressão de 0,6 a 0,8 kg/cm², registrada no manômetro de entrada do filtro.

1.4.1.21 - Drenar todas as saídas seguindo a sequência indicada no ponto 1.4.1.17, tendo o cuidado de fechar cada uma delas somente quando sair meio puro por elas. Isto permite eliminar toda a água de lavagem do filtro.

1.4.1.22 - Baixar a pressão da linha de meio, fechar a passagem ao filtro-domnick da mesma e abrir e fechar os registros que correspondam até chegar ao tanque que receberá o meio.

1.4.1.23 - O meio pode ser filtrado diretamente sobre um cultivo para seu uso imediato e/ou num tanque livre e balões para ser previamente controlado.

1.4.1.24 - Para colher amostra de controle, ligar o Erlenmeyer ao dreno do manômetro de saída que tem uma mangueira em forma de Y para a drenagem e para a colheita de amostra.

1.4.1.25 - Ligar os balões para meio e encher na forma seqüencial.

1.4.1.26 - O meio recebido no tanque (sem cultivo) e nos balões deve ficar a 37°C até o dia seguinte para fazer o controle bacteriológico. Depois deve ser conservado a 4°C.

1.4.2 Clarificação do antígeno. Filtro Orion pequeno

Materiais

1.4.2.1 - Filtro preparado e esterilizado de acordo com as instruções (pág. 27).

1.4.2.2. - Nove placas K2 servem para clarificar 400 a 500 litros

de antígeno. Deve-se calcular uma perda de 20-25 litros de antígeno durante a filtração.

1.4.2.3 - Os materiais são essencialmente os mesmos que se usam para a filtração com o filtro Orion C40.

Procedimento

1.4.2.4 - Segue-se o mesmo procedimento indicado para a clarificação de antígeno no filtro PILOT A-20-Z.

1.4.3 Filtração de meios de crescimento e manutenção e clarificação de antígeno. Filtro PILOT A-20-Z

Materiais

1.4.3.1 - Filtro preparado e esterilizado de acordo com o tipo e quantidade de meio que se deseja filtrar.

1.4.3.2 - Para clarificar antígeno prepara-se o filtro com placas K2 para a filtração simples e depois se esteriliza. Doze placas são suficientes para clarificar 100 a 150 litros de antígeno.

1.4.3.3 - Deve-se sempre calcular uma perda de 5 a 10 litros de meio ou antígeno durante a filtração.

1.4.3.4 - Os materiais necessários são essencialmente os mesmos que os usados na filtração com o filtro Orion C40.

Procedimento

- Filtração de meio:

1.4.3.5 - Para a filtração de meio segue-se basicamente o mesmo procedimento empregado na filtração pelo filtro Orion C40.

- Clarificação de antígeno:

1.4.3.6 - Ligar a mangueira de saída do filtro à linha de transferência para o tanque de inativação.

1.4.3.7 - Lavar o filtro com água desmineralizada estéril, seguindo as mesmas instruções indicadas para o filtro Orion C40 e tendo

o cuidado de que os drenos se abram e fechem seqüencialmente no sentido do fluxo do líquido.

1.4.3.8 - Encher com clorofórmio as duas saídas inferiores do tanque de inativação, usando um sifão e pera de pressão manual.

1.4.3.9 - Ligar a mangueira da linha de transferência à entrada do inativante no tanque respectivo.

1.4.3.10 - Purgar a saída de sobrenadante do tanque de tratamento para eliminar o sedimento celular acumulado na linha.

1.4.3.11 - Ligar a mangueira da saída do sobrenadante do tanque de tratamento à entrada do filtro.

1.4.3.12 - Iniciar a passagem de antígeno com uma pressão de 5 lb/pol² registrada no tanque de tratamento. A pressão pode-se aumentar paulatinamente até alcançar um máximo de 20 lb/pol².

1.4.3.13 - Drenar todas as saídas seguindo a mesma seqüência de lavagem do filtro, tendo o cuidado de fechar cada uma delas somente quando saia antígeno puro por elas. Receber o líquido em recipientes com carbonato a 4%.

1.4.3.14 - Eliminar a pressão da linha de transferência, fechar a passagem ao filtro-domnick da mesma e abrir todos os registros desde o filtro até o tanque de inativação, para iniciar a filtração.

1.4.3.15 - Ao terminar a filtração eliminar, em recipientes com carbonato a 4%, todo o antígeno restante no filtro.

1.4.3.16 - Descontaminar bem o tanque de tratamento, a linha de transferência e todos os materiais utilizados no processo.

1.5. CULTIVO DE CÉLULAS BHK-21 CLONE 13 DE SUSPENSÃO

1.5.1 Congelamento e descongelamento de células

Materiais

1.5.1.1 - 8 litros de células com 1×10^6 cél/ml, pH 7,2-7,3.

1.5.1.2 - 500 ml de meio para congelar (MEM 12% soro bovino + 10% glicerina).

1.5.1.3 - 11 frascos de vacina de 50 ml.

1.5.1.4 - Tampas e opérculos para frascos.

1.5.1.5 - Operculador.

1.5.1.6 - Pera de pressão manual.

1.5.1.7 - TPB para controle bacteriológico.

1.5.1.8 - Pipetas.

1.5.1.9 - Bomba de pressão.

1.5.1.10 - Rolhas de borracha nº 0.

1.5.1.11 - Caixinhas de isopor.

1.5.1.12 - Banho-maria a 37°C.

1.5.1.13 - Garrafas-roller com tampa.

1.5.1.14 - MEM 10% soro bovino, pH 6,8.

1.5.1.15 - Cesta para roller.

Procedimento

- Congelamento:

1.5.1.16 - Fazer a contagem de células de um cultivo de 24 horas, em balão. O número de células deverá estar entre 1×10^6 a $1,2 \times 10^6$ cél/ml. Simultaneamente fazer um controle bacteriológico.

1.5.1.17 - Sedimentar durante 24 horas a 4°C.

1.5.1.18 - Eliminar todo o meio de cultivo com a bomba de pressão, tendo o cuidado de não agitar as células.

1.5.1.19 - Adicionar 500 ml de meio de congelamento ao balão e agitar suavemente para homogeneizar as células.

1.5.1.20 - Distribuir a suspensão celular nos 11 frascos de vacina, tampar e amarrar com barbante.

1.5.1.21 - Colocar em caixinhas de isopor individuais e congelar a -70°C no congelador-Revco. A caixa de isopor permite um congelamento lento.

- Descongelamento:

1.5.1.22 - Retirar um frasco de células do congelador e submergir em banho-maria a 37°C para descongelar rapidamente.

1.5.1.23 - Semear os 50 ml de suspensão em garrafa-roller.

1.5.1.24 - Adicionar 250-300 ml de meio de crescimento.

1.5.1.25 - Girar por 24-48 horas a 37°C .

1.5.1.26 - Continuar com o esquema de cultivo em balões e depois em tanques.

1.5.2 Esquema de cultivo em balões

1.5.2.1 - Segue-se a seguir o esquema apresentado durante 6 semanas. Depois reinicia-se com células de passagem baixa:

Dia 1	- 50 ml células congeladas + 250 ml MEM-10	300 ml
Dia 2	- 300 ml células + 700 ml MEM-10	1 litro
Dia 3	- 1 litro células + 1 litro MEM-10	2 litros
Dia 4	- 2 litros células + 2 litros MEM-10	4 litros
Dia 5	- 4 litros células + 4 litros MEM-10	8 litros
Dia 6	- 8 litros células + 8 litros MEM-10	16 litros
Dia 7	- 16 litros células + 16 litros MEM-10	32 litros
Dia 8	- 8 <u>l.</u> 8 <u>l.</u> 8 <u>l.</u> 8 <u>l.</u> 8 <u>l.</u> MEM-10	
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <hr style="width: 100%; border: 0.5px solid black;"/> Tanque 120 <u>l.</u> </div> <div style="text-align: center;"> <hr style="width: 100%; border: 0.5px solid black;"/> a 4°C para iniciar o escalamento na semana seguinte. </div> </div>	

Materiais

1.5.2.2 - Balões de 2 litros com sifão e barra magnética.

1.5.2.3 - Balões de 4 litros com sifão e barra magnética.

1.5.2.4 - Balões de 10 litros com sifão e barra magnética.

- 1.5.2.5 - Balões de 20 litros com sifão e barra magnética.
- 1.5.2.6 - Mangueiras de transferência.
- 1.5.2.7 - Mangueiras-tampa-sifão.
- 1.5.2.8 - Erlenmeyer de 250 ml com sifão para colheita de amostras.
- 1.5.2.9 - Células em roller (300 ml) com crescimento de 24-48 horas (ver congelamento e descongelamento).
- 1.5.2.10 - Meio de crescimento MEM-10 pH 6,8 e pH 7,6.
- 1.5.2.11 - Agitadores magnéticos.
- 1.5.2.12 - TPB.
- 1.5.2.13 - Pipetas.
- 1.5.2.14 - Seringas.
- 1.5.2.15 - Mesa magnética.
- 1.5.2.16 - Bomba de pressão.

Procedimento

- 1.5.2.17 - Agitar bem a garrafa-roller para desprender as células, passar para o balão de cultivo de 2 litros e fazer o controle bacteriológico.
- 1.5.2.18 - Adicionar 700 ml de MEM-10 pH 6,8 e agitar durante 18-24 horas a 37°C (total 1 litro).
- 1.5.2.19 - Colher amostra, fazer contagem celular e controle bacteriológico. A contagem deve dar um mínimo de 1×10^6 cél/ml.
- 1.5.2.20 - Adicionar 1 litro de MEM-10 e passar para um balão de 4 litros (total 2 litros).
- 1.5.2.21 - Agitar durante 18-24 horas a 37°C.
- 1.5.2.22 - Colher amostra, fazer contagem celular e controle bacteriológico.

1.5.2.23 - Adicionar 2 litros de MEM-10 pH 7,6 e passar para um balão de 10 litros (total 4 litros).

1.5.2.24 - Agitar durante 18-24 horas a 37°C.

1.5.2.25 - Colher amostra, fazer contagem celular e controle bacteriológico.

1.5.2.26 - Adicionar 4 litros de MEM-10 e passar para um balão de 20 litros (total 8 litros).

1.5.2.27 - Agitar durante 18-24 horas a 37°C.

1.5.2.28 - Colher amostra, fazer contagem celular e controle bacteriológico.

1.5.2.29 - Adicionar 8 litros de MEM-10 pH 7,6 e passar para 2 balões de 20 litros (8 litros em cada um, total 16 litros).

1.5.2.30 - Agitar durante 18-24 horas a 37°C.

1.5.2.31 - Colher amostra de cada balão, fazer contagem celular e controle bacteriológico.

1.5.2.32 - Adicionar 8 litros de MEM-10 pH 7,6 em cada balão e passar para 4 balões de 20 litros (total 32 litros).

1.5.2.33 - Agitar durante 18-24 horas a 37°C.

1.5.2.34 - Colher amostra de cada balão, fazer contagem celular e controle bacteriológico.

1.5.2.35 - Passar 3 balões (24 litros) para tanque de 120 litros e continuar com o esquema de cultivo em tanques.

1.5.2.36 - Adicionar 4 litros de MEM-10 pH 7,6 ao 4º balão, fazer contagem celular e controle bacteriológico. Conservar a 4°C para iniciar o ciclo da próxima semana.

1.5.2.37 - As células serão passadas por 6 semanas nesta forma, quando se iniciará outro ciclo de descongelamento. Isto evita que as células atinjam passagens muito elevadas.

1.5.3 Esquema de cultivo em tanques para semear garrafas-roller

1.5.3.1 - Pode-se seguir este esquema em 2 cultivos paralelos para semear 1500 a 1800 garrafas-roller por semana, de acordo com o indicado no programa para a produção de antígeno em garrafas-roller somente (ver ponto 1.8.1).

Dia 1	-	24 lts células +	26 lts MEM-10	50 litros
Dia 2	-	50 lts células +	40 lts MEM-10	90 litros
Dias 3 e 4	-	50-60 lts células +	180 lts MEM-10	230-240 litros

Deixar 30-40 litros reservados em tanques ou balões.

Semear 750-800 rollers com 300 ml cada uma.

Materiais

- 1.5.3.2 - Balões com 24 litros de células.
- 1.5.3.3 - Tanque de 120 litros estéril.
- 1.5.3.4 - Tanque de 450 litros estéril.
- 1.5.3.5 - Linha de meio estéril.
- 1.5.3.6 - Linha de transferência estéril.
- 1.5.3.7 - Mangueiras de transferência.
- 1.5.3.8 - Mangueiras-tampa-sifão.
- 1.5.3.9 - Meio de crescimento MEM-10 pH 7,6.
- 1.5.3.10 - Seringas.
- 1.5.3.11 - TPB.
- 1.5.3.12 - Bomba de pressão.
- 1.5.3.13 - Garrafas-roller em cestas de 9 cada uma.
- 1.5.2.14 - Tampas estêreis.
- 1.5.3.15 - Mangueira com campânula para semeadura.
- 1.5.3.16 - Mesa de semear (idem inoculação).

Procedimento

1.5.3.17 - Eliminar a pressão do tanque de 120 litros.

1.5.3.18 - Eliminar a pressão da linha de meio e fechar o registro de comunicação desta ao tanque.

1.5.3.19 - Ligar a mangueira de transferência dos balões de células à entrada da linha de meio do tanque e abrir os registros de entrada ao mesmo.

1.5.3.20 - Ligar a bomba ao filtro do sifão dos balões, soltar as pinças, agitar bem os balões e passar as células ao tanque. O cultivo deve ter de 1×10^6 a $1,2 \times 10^6$ cél/ml.

1.5.3.21 - Iniciar a agitação a 1/3 da sua velocidade máxima (\pm 30-40 rpm).

1.5.3.22 - Adicionar 20 litros de meio da mesma forma como se fez com as células. A suspensão ficará com 5×10^5 a 6×10^5 cél/ml.

1.5.3.23 - Fechar os registros de entrada ao tanque, aumentar a pressão a 10 lb e aumentar a agitação a 110-120 rpm.

1.5.3.24 - Circular água a 37°C pela camisa do tanque e incubar por 18-24 horas.

1.5.3.25 - Durante o cultivo fazer controles de pH, contagem celular e controle bacteriológico nos seguintes tempos:

- a) uma hora depois do início do cultivo;
- b) 1/2 hora antes de terminar o período do trabalho;
- c) as 9 horas da noite;
- d) as 8 horas da manhã seguinte;
- e) antes de fazer uma nova passagem.

1.5.3.26 - Se em algum destes controles o pH baixa de 7,3, fazer circular ar comprimido pelo tanque para eliminar o excesso de CO₂ produzido pelo metabolismo celular. O sistema de fluxo de ar dos tanques consiste do seguinte:

- a) fluxômetro;
- b) entrada de ar através de um filtro-domnick com terminais na profundidade e na superfície;
- c) saída de ar através do filtro-domnick.

1.5.3.27 - O procedimento para regular o fluxo de ar é o seguinte:

- a) baixar a pressão do tanque através do filtro-domnick de saída;
- b) abrir a entrada de ar na superfície;
- c) regular o fluxômetro a 5 litros/minuto ou mais, dependendo da necessidade de renovação de ar. O fluxo deve ser aumentado a 10, 20, 30 ou 40 litros/minuto, dependendo da diminuição do pH. O pH deve ser mantido acima de 7,0;
- d) regular a pressão interna do tanque a 5-8 lbs/pol².

1.5.3.28 - Quando o cultivo atingir de 1×10^6 a $1,2 \times 10^6$ células/ml, fazer uma nova passagem de células, aumentando o meio a 90-100 litros mediante a adição de MEM-10 de outro tanque ou de balões.

1.5.3.29 - Para adicionar o meio de balões, parar o fluxo de ar, reduzir a pressão a 0 e continuar na forma indicada nos pontos 1.5.3.21 a 1.5.3.26.

1.5.3.30 - Para adicionar o meio de outro tanque, esterilizar a linha de transferência, parar o fluxo de ar e reduzir a pressão a 0 no tanque com cultivo. Depois aumentar a pressão a 10 lb/pol² no tanque doador, fechar e abrir os registros que correspondam na linha de transferência e proceder à adição de meio no volume desejado, tendo o cuidado de manter a pressão adequada. Continuar na forma indicada nos pontos 1.5.3.22 a 1.5.3.27.

1.5.3.31 - Quando o cultivo alcançar de $1,2 \times 10^6$ a $1,3 \times 10^6$, retirar 30-40 litros de células em balões para deixar de reserva a 4°C.

1.5.3.32 - Passar os 60 litros restantes a um tanque que contenha 180 litros de MEM-10, mediante o seguinte procedimento:

- a) esterilizar a linha de transferência;
- b) baixar a pressão do tanque que contém o meio;
- c) abrir e fechar os registros que correspondam à linha de transferência;
- d) passar os 60 litros de células ao tanque de 450 litros com 180 litros de MEM-10, tendo o cuidado de agitar a 80-100 rpm.

1.5.3.33 - Instalar a mangueira de semear para a sala correspondente e semear 300 ml de suspensão por garrafa (Ver cálculos pág. 55).

1.5.3.34 - Transportar as cestas com garrafas à estufa a 37°C, girar as estantes-roller e incubar durante 72 horas.

1.5.3.35 - No caso de semear as garrafas com 400.000 cél/ml com 300 ml, o tempo de incubação se reduz a 48 horas.

1.5.4 Esquema de cultivo em tanques para a produção de vírus

1.5.4.1 - Este esquema pode ser seguido em 2 cultivos paralelos para inocular dois tanques por semana, de acordo com o indicado no programa para a produção de antígeno em suspensão somente (ver ponto 1.8.2).

Dia 1	- 40 litros células + 40 litros meio	80 litros
Dia 2	- 80 litros células + 110 litros meio	190 litros
Dia 3	- 190 litros células + 190 litros meio	380 litros
Dia 5	- Sedimentação	
Dia 5	- Eliminar meio de crescimento e adicionar meio de manutenção.	

Materiais

1.5.4.2 - Os mesmos materiais utilizados no esquema para semear em roller, com exceção das garrafas e as tampas.

Procedimento

1.5.4.3 - Seguir o mesmo procedimento básico utilizado no cultivo de células para a semeadura final em garrafas-roller.

1.5.4.4 - É muito importante que nestes cultivos o pH não baixe de 7,0, especialmente no último, antes da sedimentação, que deve manter-se, sempre que possível, em 7,2. Para isto, deve-se vigiar continuamente para adicionar, periodicamente, ar em profundidade.

1.5.4.5 - Quando a contagem de células estiver entre $1,2 \times 10^6$ a $1,4 \times 10^6$, parar a agitação, eliminar a água a 37°C da camisa e trocar por água a 4°C .

1.5.4.6 - A sedimentação deve ser feita a 4°C durante 24 horas até que a contagem no sobrenadante não seja maior de 50.000 cél/ml.

1.6 CÁLCULOS

1.6.1 Contagem de células

Materialis

1.6.1.1 - Hemocitômetro conservado em álcool.

1.6.1.2 - Microscópio comum com objetiva 10x e ocular 10x.

1.6.1.3 - Solução de eosina a 2%.

1.6.1.4 - Pipetas de 1 e 5 ml.

1.6.1.5 - Pipetas-Pasteur.

1.6.1.6 - Tubos de hemólise.

1.6.1.7 - Seringa estéril de 20 com agulha 30 x 18.

1.7.1.8 - Perinha de pressão manual.

1.6.1.9 - Frascos de 20 ml para colher amostras.

1.6.1.10 - Erlenmeyer com sifão.

1.6.1.11 - Bico de Bunsen.

Procedimento

1.6.1.12 - Para colher amostras procede-se da seguinte maneira:

a) Tanques

- retirar a contra-tampa de aço do orifício para colher amostras do tanque;
- limpar bem o opérculo de borracha com uma gase embebida com álcool iodado;
- adicionar um pouco de álcool iodado ao opérculo e flambar;
- retirar a amostra com a seringa;
- usar o resto para a contagem celular.

b) Balões

- uma vez flambado, retira-se a tampa do sifão do balão e liga-se o Erlenmeyer de 200 ml com sifão à entrada do mesmo;
- com a perinha de pressão ligada ao filtro do sifão, transferir uma amostra de 20 a 30 ml ao Erlenmeyer;
- retirar este tampando a saída do balão;
- aproveitar a amostra para o controle bacteriológico em TPB e para contagem celular.

1.6.1.13 - Para a contagem de células procede-se da seguinte

forma:

- pipetar a suspensão celular 10-20 vezes e diluir 1 ml da mesma em 3 ml de cosina a 2% e misturar bem em tubo de hemólise. Deixar em absorção por 2 minutos;
- secar bem a câmara de contagem, molhar levemente os suportes da lâmina e colocá-la sobre os mesmos, pressionando para que fique bem aderida;
- examinar as células ao microscópio e contar as vivas, refringentes e não tingidas em 6 quadrados da câmara (Fig. 10).

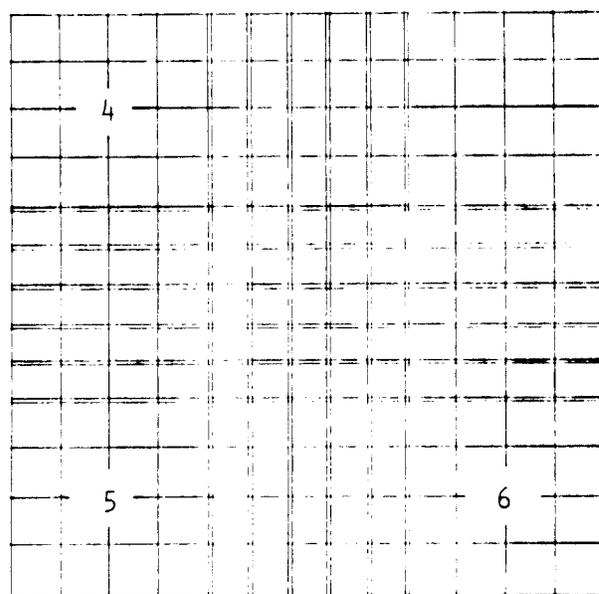
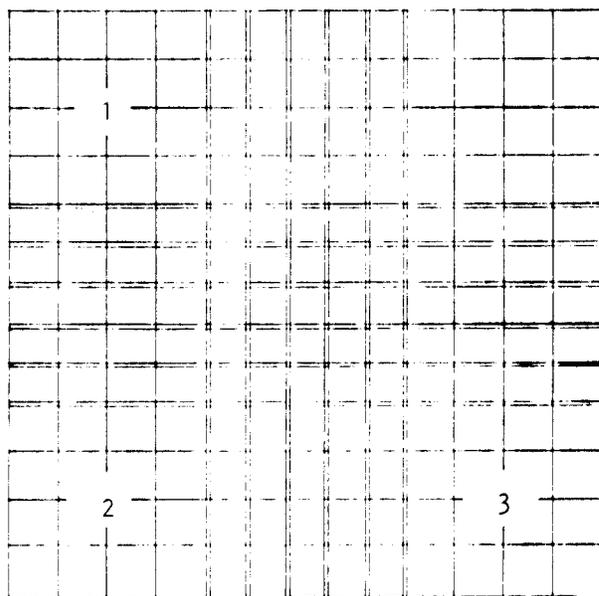


FIGURA 10. Contagem de células vivas, refringentes e não tingidas.

Cálculo

1.6.1.14 - Determinar a quantidade de células por ml mediante o uso da Tabela das páginas 51 a 54 ou fazendo um cálculo matemático:

- a) tabela (exemplo) - se se obtém uma contagem de 120 células nos 6 quadrados, a tabela indica 800.000 cél/ml;
- b) cálculo (exemplo) - contagem de 120 células em 6 quadrados:
- volume num quadrado: 1 mm (lado) x 1 mm (lado) x 0,1 mm (profundidade) = 0,1 mm³; portanto, 120 células em 0,1 mm³
 - contar 6 quadrados: 120 : 6 = 20 células por quadrado;
 - 1 mm³ = 10 x 0,1 mm³
20 células x 10 = 200 cél. em 1 mm³
 - 1 cm³ = 1000 x 1 mm³
200 células x 1000 = 200.000 cél. em 1 cm³
 - fator de diluição = 1:4
200.000 cél. x 4 = 800.000 cél. em 1 cm³ de suspensão
 - o número de células em 1 ml é 10.000 vezes maior que o encontrado em 0,1 mm³, vezes o fator de diluição.

1.6.2 Cálculos para passagens de células e inoculação de vírus

Passagem balão/balão, balão/tanque e tanque/tanque

1.6.2.1 - A semeadura nestes casos deve ser feita com 600.000 cél/ml para obter um bom crescimento em 18-24 horas.

1.6.2.2 - Se temos uma suspensão de 24 litros com 1.056.000 cél/ml, o cálculo do volume adicional de meio a acrescentar é o seguinte:

TABELA. Contagem de células

1 -	6.800	37 -	246.600	73 -	486.800	109 -	726.800	145 -	966.800	181 -	1.206.800
2 -	13.200	38 -	253.400	74 -	493.200	110 -	733.200	146 -	973.200	182 -	1.213.200
3 -	20.000	39 -	260.000	75 -	500.000	111 -	740.000	147 -	980.000	183 -	1.220.000
4 -	26.800	40 -	266.600	76 -	506.800	112 -	746.800	148 -	986.800	184 -	1.226.800
5 -	33.200	41 -	273.400	77 -	513.200	113 -	753.200	149 -	993.200	185 -	1.233.200
6 -	40.000	42 -	280.000	78 -	520.000	114 -	760.000	150 -	1.000.000	186 -	1.240.000
7 -	46.800	43 -	286.600	79 -	526.800	115 -	766.800	151 -	1.006.800	187 -	1.246.800
8 -	53.200	44 -	293.400	80 -	533.200	116 -	773.200	152 -	1.013.200	188 -	1.253.200
9 -	60.000	45 -	300.000	81 -	540.000	117 -	780.000	153 -	1.020.000	189 -	1.260.000
10 -	66.800	46 -	306.600	82 -	546.800	118 -	786.800	154 -	1.026.800	190 -	1.266.800
11 -	73.200	47 -	313.400	83 -	553.200	119 -	793.200	155 -	1.033.200	191 -	1.273.200
12 -	80.000	48 -	320.000	84 -	560.000	120 -	800.000	156 -	1.040.000	192 -	1.280.000
13 -	86.800	49 -	326.600	85 -	566.800	121 -	806.800	157 -	1.046.800	193 -	1.286.800
14 -	93.200	50 -	333.400	86 -	573.200	122 -	813.200	158 -	1.053.200	194 -	1.293.200
15 -	100.000	51 -	340.000	87 -	580.000	123 -	820.000	159 -	1.060.000	195 -	1.300.000
16 -	106.800	52 -	346.600	88 -	586.600	124 -	826.800	160 -	1.066.800	196 -	1.306.800
17 -	113.200	53 -	353.400	89 -	593.200	125 -	833.200	161 -	1.073.200	197 -	1.313.200
18 -	120.000	54 -	360.000	90 -	600.000	126 -	840.000	162 -	1.080.000	198 -	1.320.000
19 -	126.800	55 -	366.800	91 -	606.800	127 -	846.800	163 -	1.086.800	199 -	1.326.800
20 -	133.200	56 -	373.200	92 -	613.200	128 -	853.200	164 -	1.093.200	200 -	1.333.200
21 -	140.000	57 -	380.000	93 -	620.000	129 -	860.000	165 -	1.100.000	201 -	1.340.000
22 -	146.800	58 -	386.800	94 -	626.800	130 -	866.800	166 -	1.106.800	202 -	1.346.800
23 -	153.200	59 -	393.200	95 -	633.200	131 -	873.200	167 -	1.113.200	203 -	1.353.200
24 -	160.000	60 -	400.000	96 -	640.000	132 -	880.000	168 -	1.120.000	204 -	1.360.000
25 -	166.800	61 -	406.800	97 -	646.800	133 -	886.800	169 -	1.126.800	205 -	1.366.800
26 -	173.200	62 -	413.200	98 -	653.200	134 -	893.200	170 -	1.133.200	206 -	1.373.200
27 -	180.000	63 -	420.000	99 -	660.000	135 -	900.000	171 -	1.140.000	207 -	1.380.000
28 -	186.800	64 -	426.800	100 -	666.800	136 -	906.800	172 -	1.146.700	208 -	1.386.800
29 -	193.400	65 -	433.200	101 -	673.200	137 -	913.200	173 -	1.153.200	209 -	1.393.200
30 -	200.000	66 -	440.000	102 -	680.000	138 -	920.000	174 -	1.160.000	210 -	1.400.000
31 -	206.600	67 -	446.800	103 -	686.800	139 -	926.800	175 -	1.166.800	211 -	1.408.800
32 -	213.400	68 -	453.200	104 -	693.200	140 -	933.200	176 -	1.173.200	212 -	1.413.200
33 -	220.000	69 -	460.000	105 -	700.000	141 -	940.000	177 -	1.180.000	213 -	1.420.000
34 -	226.600	70 -	466.800	106 -	706.800	142 -	946.800	178 -	1.186.800	214 -	1.426.800
35 -	233.400	71 -	473.200	107 -	713.200	143 -	953.200	179 -	1.193.200	215 -	1.433.200
36 -	240.000	72 -	480.000	108 -	720.000	144 -	960.000	180 -	1.200.000	216 -	1.440.000

TABELA. Contagem de Células (Cont.)

217 -	1.446,800	292 -	1.680,000	287 -	1.913,200	322 -	2.146,800	357 -	2.380,000	392 -	2.613,200
218 -	1.453,200	293 -	1.686,800	288 -	1.920,000	323 -	2.153,200	358 -	2.386,800	393 -	2.620,000
219 -	1.460,000	294 -	1.696,200	289 -	1.926,800	324 -	2.160,000	359 -	2.393,200	394 -	2.626,800
220 -	1.466,800	295 -	1.700,000	290 -	1.933,200	325 -	2.166,800	360 -	2.400,000	395 -	2.633,200
221 -	1.473,200	296 -	1.706,800	291 -	1.940,000	326 -	2.173,200	361 -	2.406,800	396 -	2.640,000
222 -	1.480,000	297 -	1.713,200	292 -	1.946,800	327 -	2.180,000	362 -	2.413,200	397 -	2.646,800
223 -	1.486,800	298 -	1.720,000	293 -	1.953,200	328 -	2.186,800	363 -	2.420,000	398 -	2.653,200
224 -	1.493,200	299 -	1.726,800	294 -	1.960,000	329 -	2.193,200	364 -	2.426,800	399 -	2.660,000
225 -	1.500,000	300 -	1.733,200	295 -	1.966,800	330 -	2.200,000	365 -	2.433,200	400 -	2.666,800
226 -	1.506,800	301 -	1.740,000	296 -	1.973,200	331 -	2.206,800	366 -	2.440,000	401 -	2.673,200
227 -	1.513,200	302 -	1.746,800	297 -	1.980,000	332 -	2.213,200	367 -	2.446,800	402 -	2.680,000
228 -	1.520,000	303 -	1.753,200	298 -	1.986,800	333 -	2.220,000	368 -	2.453,200	403 -	2.686,800
229 -	1.526,800	304 -	1.760,000	299 -	1.993,200	334 -	2.226,800	369 -	2.460,000	404 -	2.693,200
230 -	1.533,200	305 -	1.766,800	300 -	2.000,000	335 -	2.233,200	370 -	2.466,800	405 -	2.700,000
231 -	1.540,000	306 -	1.773,200	301 -	2.006,800	336 -	2.240,000	371 -	2.473,200	406 -	2.706,800
232 -	1.546,800	307 -	1.780,000	302 -	2.013,200	337 -	2.246,800	372 -	2.480,000	407 -	2.713,200
233 -	1.553,200	308 -	1.786,800	303 -	2.020,000	338 -	2.253,200	373 -	2.486,800	408 -	2.720,000
234 -	1.560,000	309 -	1.793,200	304 -	2.026,800	339 -	2.260,000	374 -	2.493,200	409 -	2.726,800
235 -	1.566,800	310 -	1.800,000	305 -	2.033,200	340 -	2.266,800	375 -	2.500,000	410 -	2.733,200
236 -	1.573,200	311 -	1.806,800	306 -	2.040,000	341 -	2.273,200	376 -	2.506,800	411 -	2.740,000
237 -	1.580,000	312 -	1.813,200	307 -	2.046,800	342 -	2.280,000	377 -	2.513,200	412 -	2.746,800
238 -	1.586,800	313 -	1.820,000	308 -	2.053,200	343 -	2.286,800	378 -	2.520,000	413 -	2.753,200
239 -	1.593,200	314 -	1.826,800	309 -	2.060,000	344 -	2.293,200	379 -	2.526,800	414 -	2.760,000
240 -	1.600,000	315 -	1.833,200	310 -	2.066,800	345 -	2.300,000	380 -	2.533,200	415 -	2.766,800
241 -	1.606,800	316 -	1.840,000	311 -	2.073,200	346 -	2.306,800	381 -	2.540,000	416 -	2.773,200
242 -	1.613,200	317 -	1.846,800	312 -	2.080,000	347 -	2.313,200	382 -	2.546,800	417 -	2.780,000
243 -	1.620,000	318 -	1.853,200	313 -	2.086,800	348 -	2.320,000	383 -	2.553,200	418 -	2.786,800
244 -	1.626,800	319 -	1.860,000	314 -	2.093,200	349 -	2.326,800	384 -	2.560,000	419 -	2.793,200
245 -	1.633,200	320 -	1.866,800	315 -	2.100,000	350 -	2.333,200	385 -	2.566,800	420 -	2.800,000
246 -	1.640,000	321 -	1.873,200	316 -	2.106,800	351 -	2.340,000	386 -	2.573,200	421 -	2.806,800
247 -	1.646,800	322 -	1.880,000	317 -	2.113,200	352 -	2.346,800	387 -	2.580,000	422 -	2.813,200
248 -	1.653,200	323 -	1.886,800	318 -	2.120,200	353 -	2.353,200	388 -	2.586,800	423 -	2.820,000
249 -	1.660,000	324 -	1.893,200	319 -	2.126,800	354 -	2.360,000	389 -	2.593,200	424 -	2.826,800
250 -	1.666,800	325 -	1.900,000	320 -	2.133,200	355 -	2.366,800	390 -	2.600,000	425 -	2.833,200
251 -	1.673,200	326 -	1.906,800	321 -	2.140,000	356 -	2.373,200	391 -	2.606,800	426 -	2.840,000

TABELA. Contagem de Células (Cont.)

427 - 2.846.800	463 - 3.086.800	499 - 3.326.800	535 - 3.566.800	571 - 3.806.800	607 - 4.046.800
428 - 2.853.200	464 - 3.093.200	500 - 3.333.200	536 - 3.573.200	572 - 3.813.200	608 - 4.053.200
429 - 2.860.000	465 - 3.100.000	501 - 3.340.000	537 - 3.580.000	573 - 3.820.000	609 - 4.060.000
430 - 2.866.800	466 - 3.106.800	502 - 3.346.800	538 - 3.586.800	574 - 3.826.800	610 - 4.066.800
431 - 2.873.200	467 - 3.113.200	503 - 3.353.200	539 - 3.593.200	575 - 3.833.200	611 - 4.073.200
432 - 2.880.000	468 - 3.120.000	504 - 3.360.000	540 - 3.600.000	576 - 3.840.000	612 - 4.080.000
433 - 2.886.800	469 - 3.126.800	505 - 3.366.800	541 - 3.606.800	577 - 3.846.800	613 - 4.086.800
434 - 2.893.200	470 - 3.133.200	506 - 3.373.200	542 - 3.613.200	578 - 3.853.200	614 - 4.093.200
435 - 2.900.000	471 - 3.140.000	507 - 3.380.000	543 - 3.620.000	579 - 3.860.000	615 - 4.100.000
436 - 2.906.800	472 - 3.146.800	508 - 3.386.800	544 - 3.626.800	580 - 3.866.800	616 - 4.106.800
437 - 2.913.200	473 - 3.153.200	509 - 3.393.200	545 - 3.633.200	581 - 3.873.200	617 - 4.113.200
438 - 2.920.000	474 - 3.160.000	510 - 3.400.000	546 - 3.640.000	582 - 3.880.000	618 - 4.120.000
439 - 2.926.800	475 - 3.166.800	511 - 3.406.800	547 - 3.646.800	583 - 3.886.800	619 - 4.126.800
440 - 2.933.200	476 - 3.173.200	512 - 3.413.200	548 - 3.653.200	584 - 3.893.200	620 - 4.133.200
441 - 2.940.000	477 - 3.180.000	513 - 3.420.000	549 - 3.660.000	585 - 3.900.000	621 - 4.140.000
442 - 2.946.800	478 - 3.186.800	514 - 3.426.800	550 - 3.666.800	586 - 3.906.800	622 - 4.146.800
443 - 2.953.200	479 - 3.193.200	515 - 3.433.200	551 - 3.673.200	587 - 3.913.200	623 - 4.153.200
444 - 2.960.000	480 - 3.200.000	516 - 3.440.000	552 - 3.680.000	588 - 3.920.000	624 - 4.160.000
445 - 2.966.800	481 - 3.206.800	517 - 3.446.800	553 - 3.686.800	589 - 3.926.800	625 - 4.166.800
446 - 2.973.200	482 - 3.213.200	518 - 3.453.200	554 - 3.693.200	590 - 3.933.200	626 - 4.173.200
447 - 2.980.000	483 - 3.220.000	519 - 3.460.000	555 - 3.700.000	591 - 3.940.000	627 - 4.180.000
448 - 2.986.800	484 - 3.226.800	520 - 3.466.800	556 - 3.706.800	592 - 3.946.800	628 - 4.186.800
449 - 2.993.200	485 - 3.233.200	521 - 3.473.200	557 - 3.713.200	593 - 3.953.200	629 - 4.193.200
450 - 3.000.000	486 - 3.240.000	522 - 3.480.000	558 - 3.720.000	594 - 3.960.000	630 - 4.200.000
451 - 3.006.800	487 - 3.246.800	523 - 3.486.800	559 - 3.726.800	595 - 3.966.800	631 - 4.206.800
452 - 3.013.200	488 - 3.253.200	524 - 3.493.200	560 - 3.733.200	596 - 3.973.200	632 - 4.213.200
453 - 3.020.000	489 - 3.260.000	525 - 3.500.000	561 - 3.740.000	597 - 3.980.000	633 - 4.220.000
454 - 3.026.800	490 - 3.266.800	526 - 3.506.800	562 - 3.746.800	598 - 3.986.800	634 - 4.226.800
455 - 3.033.200	491 - 3.273.200	527 - 3.513.200	563 - 3.753.200	599 - 3.993.200	635 - 4.233.200
456 - 3.040.000	492 - 3.280.000	528 - 3.520.000	564 - 3.760.000	600 - 4.000.000	636 - 4.240.000
457 - 3.046.800	493 - 3.286.800	529 - 3.526.800	565 - 3.766.800	601 - 4.006.800	637 - 4.246.800
458 - 3.053.200	494 - 3.293.200	530 - 3.533.200	566 - 3.773.200	602 - 4.013.200	638 - 4.253.200
459 - 3.060.000	495 - 3.300.000	531 - 3.540.000	567 - 3.780.000	603 - 4.020.000	639 - 4.260.000
460 - 3.066.800	496 - 3.306.800	532 - 3.546.800	568 - 3.786.800	604 - 4.026.800	640 - 4.266.800
461 - 3.073.200	497 - 3.313.200	533 - 3.553.200	569 - 3.793.200	605 - 4.033.200	641 - 4.273.200
462 - 3.080.000	498 - 3.320.000	534 - 3.560.000	570 - 3.800.000	606 - 4.040.000	642 - 4.280.000

TABELA. Contagem de Células (Cont.)

643 -	4.286.800	678 -	4.520.000	713 -	4.753.200	748 -	4.986.800
644 -	4.293.200	679 -	4.526.800	714 -	4.760.000	749 -	4.993.200
645 -	4.300.000	680 -	4.533.200	715 -	4.766.800	750 -	5.000.000
646 -	4.306.800	681 -	4.540.000	716 -	4.773.200		
647 -	4.313.200	682 -	4.546.800	717 -	4.780.000		
648 -	4.320.000	683 -	4.553.200	718 -	4.786.800		
649 -	4.326.800	684 -	4.560.000	719 -	4.793.200		
650 -	4.333.200	685 -	4.566.800	720 -	4.800.000		
651 -	4.340.000	686 -	4.573.200	721 -	4.806.800		
652 -	4.346.800	687 -	4.580.000	722 -	4.813.200		
653 -	4.353.200	688 -	4.586.800	723 -	4.820.000		
654 -	4.360.000	689 -	4.593.200	724 -	4.826.800		
655 -	4.366.800	690 -	4.600.000	725 -	4.833.200		
656 -	4.373.200	691 -	4.606.800	726 -	4.840.000		
657 -	4.380.000	692 -	4.613.200	727 -	4.846.800		
658 -	4.386.800	693 -	4.620.000	728 -	4.853.200		
659 -	4.393.200	694 -	4.626.800	729 -	4.860.000		
660 -	4.400.000	695 -	4.633.200	730 -	4.866.800		
661 -	4.406.800	696 -	4.640.000	731 -	4.873.200		
662 -	4.413.200	697 -	4.646.800	732 -	4.880.000		
663 -	4.420.000	698 -	4.653.200	733 -	4.886.800		
664 -	4.426.800	699 -	4.660.000	734 -	4.893.200		
665 -	4.433.200	700 -	4.666.800	735 -	4.900.000		
666 -	4.440.000	701 -	4.673.200	736 -	4.906.800		
667 -	4.446.800	702 -	4.680.000	737 -	4.913.200		
668 -	4.453.200	703 -	4.686.800	738 -	4.920.000		
669 -	4.460.000	704 -	4.693.200	739 -	4.926.800		
670 -	4.466.800	705 -	4.700.000	740 -	4.933.200		
671 -	4.473.200	706 -	4.706.800	741 -	4.940.000		
672 -	4.480.000	707 -	4.713.200	742 -	4.946.800		
673 -	4.486.800	708 -	4.720.000	743 -	4.953.200		
674 -	4.493.200	709 -	4.726.800	744 -	4.960.000		
675 -	4.500.000	710 -	4.733.200	745 -	4.966.800		
676 -	4.506.800	711 -	4.740.000	746 -	4.973.200		
677 -	4.513.200	712 -	4.746.800	747 -	4.980.000		

$$\frac{1.056.000}{600.000} = 1,76 \text{ fator de diluição}$$

$$1,76 \times 24 = 42,24 \text{ litros volume total da sementeira}$$

$$42,24 - 24 = 18,24 \text{ litros volume do meio a ser adicionado.}$$

Passagem tanque/garrafa-roller

1.6.2.3 - A sementeira em roller se faz com 300 ml por garrafa e 330.000 cél/ml para obter um bom crescimento em 72 horas e com 400.000 cél/ml para obter um bom crescimento em 48 horas.

1.6.2.4 - Com a mesma suspensão de 24 litros com 1.056.000 cél/ml, o cálculo é o seguinte:

a) para cultivo de 72 horas

$$\frac{1.056.000}{330.000} = 3,52$$

$$3,52 \times 24 = 84,48 \text{ volume total}$$

$$84,48 - 24 = 60,48 \text{ volume de meio a ser adicionado}$$

$$84,48 : 0,300 = 282 \text{ número de garrafas a ser sementeiras}$$

b) para cultivo de 48 horas

$$\frac{1.056.000}{400.000} = 2,64$$

$$2,64 \times 24 = 63,36$$

$$63,36 - 24 = 39,36 \text{ volume de meio a ser adicionado}$$

$$63 : 0,300 = 210 \text{ número de garrafas a ser sementeiras}$$

c) para um volume fixo de meio ou um número fixo de garrafas

- Para fazer uma passagem é comum usar somente uma parte de um cultivo com um número conhecido de células.

- Por exemplo, se numa suspensão de 50 litros (50.000 ml) com 1.500.000 cél/ml se desejam semear 80 litros com 600.000 cél/ml:

i. Volume fixo de meio

$50.000 \times 1.500.000 = 7,5 \times 10^{10}$ número total de células em 50 litros.

$$7,5 \times 10^{10} : 6 \times 10^8 = 125.000 \text{ ml}$$

$125.000 : 1000 = 125$ litros diluição máxima usando os 50 litros.

Para o cálculo dos 80 litros com 600.000 cêl/ml

$$\begin{array}{r} 50 \text{ -----} 125 \\ \times \qquad \qquad \qquad 80 \end{array}$$

$$x = \frac{50 \times 80}{125} = 32 \text{ litros de suspensão com } 1.500.000 \text{ cêl/ml a ser usadas.}$$

$$80 - 32 = 48 \text{ litros de meio a ser adicionados.}$$

ii. Número fixo de garrafas

Se o objetivo é semear 1700 garrafas-roller com 300 ml cada uma com 330.000 cêl/ml, o cálculo é o seguinte:

$$1700 \times 0,300 = 510 \text{ litros de suspensão (510.000 ml)}$$

$$510.000 \times 330.000 = 1,7 \times 10^{11} \text{ número total de células}$$

$$1,7 \times 10^{11} : 1,6 \times 10^8 = 169 + 341 \text{ litros de meio}$$

$$1,7 \times 10^{11} : 1,25 \times 10^8 = 136 + 374 \text{ litros de meio}$$

$$1,7 \times 10^{11} : 1,5 \times 10^8 = 112 + 398 \text{ litros de meio}$$

Ou seja, para semear 1700 roller (510 litros de suspensão) são necessários 169 litros de um cultivo com $1,0 \times 10^8$ cêl/ml, ou 136 litros com $1,25 \times 10^8$ cêl/ml, ou 112 litros com $1,5 \times 10^8$ cêl/ml.

iii. Cálculo para o volume de meio a ser adicionado na inoculação com vírus de células em suspensão

- A suspensão a ser inoculada deve ter $2,5 \times 10^6$ cél/ml.
- O cultivo de 380 litros deve ter uma contagem de $1,2 \times 10^6$ a $1,4 \times 10^6$ cél/ml no momento de iniciar a sedimentação.
- Se a contagem ao parar o tanque for de $1,4 \times 10^6$ cél/ml e no momento de eliminar o meio for de $4,5 \times 10^4$ no sobrenadante, o total deve ser de $1,355 \times 10^6$ cél/ml sedimentadas. O cálculo do volume de meio de manutenção a ser adicionado às células sedimentadas é o seguinte:

$$\frac{1,355 \times 10^6}{2,5 \times 10^6} = 0,542 \text{ fator de diluição}$$

$$0,542 \times 380 = 206 \text{ volume de meio a ser adicionado.}$$

1.7 PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS E VÍRUS SEMENTE

1.7.1 Em garrafas-roller

Materiais

- 1.7.1.1 - Garrafas-roller com 48-72 horas de incubação.
- 1.7.1.2 - Meio de manutenção pH 7,6.
- 1.7.1.3 - Vírus-semente, em frasco com conexão para tanque.
- 1.7.1.4 - Tampas de garrafas-roller.
- 1.7.1.5 - Mangueira com campânula de inoculação.
- 1.7.1.6 - Mesa de inoculação (id. de semeadura).
- 1.7.1.7 - Funís de colheita com tanque de recepção e mangueira de conexão ao tanque de tratamento.

1.7.1.8 - Bomba peristáltica.

1.7.1.9 - Tampão glicocola.

1.7.1.10 - Tanque de tratamento estéril.

1.7.1.11 - Filtro Orion C40 estéril preparado para filtrar meio de manutenção.

1.7.1.12 - Linha de meio estéril.

1.7.1.13 - Linhas de transferência estéreis.

1.7.1.14 - Agitador magnético.

1.7.1.15 - Erlenmeyer.

1.7.1.16 - Tripsina 0,1%.

1.7.1.17 - Tanque de 450 litros, estéril.

1.7.1.18 - Clorofórmio.

Procedimento

1.7.1.19 - Tripsinizar uma garrafa-roller e fazer contagem. Se a semeadura total resulta de duas semeaduras diferentes, fazer a contagem separada de cada uma, utilizando uma garrafa.

1.7.1.20 - Para a contagem, continuar da seguinte forma:

- a) eliminar o meio de crescimento;
- b) adicionar 30 ml de tripsina 0,1% e girar manualmente para desprender todas as células;
- c) adicionar 570 ml de meio de crescimento e agitar suavemente;
- d) esvaziar a suspensão num Erlenmeyer com barra magnética e agitar durante 15 minutos para separar os grumos de células;
- e) colher amostra para fazer contagem.

1.7.1.21 - A contagem deve dar de 90 a 125 células, o que equivale a $3,6 \times 10^8$ a $5,0 \times 10^8$ células por garrafa. Quando a contagem é mais

baixa não convém passar de 200 ml de inóculo por garrafa. Nas contagens mais elevadas pode-se aumentar a 250-300 ml de inóculo, com alguns vírus.

1.7.1.22 - Filtrar meio de manutenção ao tanque de 450 litros em quantidade suficiente para o número de garrafas a ser inoculadas e para o volume de inóculo por garrafa, de acordo com o vírus e a contagem de células.

1.7.1.23 - Adicionar 2 ml de vírus-semente por litro de meio ao tanque de 450 litros e agitar a velocidade média durante 15 minutos.

1.7.1.24 - Ligar a mangueira de inoculação à linha de transferência e à mesa de inoculação.

1.7.1.25 - Iniciar o transporte das cestas com garrafas da estufa à sala de inoculação e revisar cuidadosamente para eliminar as contaminadas por bactérias e fungos.

1.7.1.26 - Retirar as tampas das garrafas, virar as cestas para eliminar o meio de crescimento e inocular cada uma com o volume previamente calculado.

1.7.1.27 - Colocar novas tampas estéreis e devolver as cestas à estufa-roller para incubar a 37°C durante 16-18 horas.

1.7.1.28 - Observar se há uma boa destruição celular e desprendimento em lâminas com aspecto mucoide e proceder à colheita.

1.7.1.29 - Ligar o aparelho de colheita à bomba peristáltica e à entrada do tanque de tratamento por clorofórmio, do qual se elimina a pressão.

1.7.1.30 - Transportar as cestas do incubador à sala de colheita e revisar cuidadosamente para eliminar as garrafas contaminadas com bactérias e fungos.

1.7.1.31 - Ativar o sistema de esfriamento a 4°C do tanque.

1.7.1.32 - Abrir os registros de entrada ao tanque de tratamento,

ativar a bomba peristáltica e iniciar a colheita virando individualmente cada garrafa nos funís. Ativar o sistema de agitação do tanque.

1.7.1.33 - Passar as garrafas vazias para a sala de lavagem.

1.7.1.34 - Quando faltarem 8 cestas, controlar o pH e adicionar 2,5 ml de tampão de glicocola por litro de antígeno para subir o pH de 7,1 a 7,3-7,4. O tampão adiciona-se sobre os funís durante a colheita do vírus.

1.7.1.35 - Paralelamente, tomar amostras do tanque para o controle bacteriológico, titulação e tipificação por fixação do complemento (FC) de determinação do título infectante.

1.7.1.36 - Calcular o volume do clorofórmio a ser usado (10 ml por litro de suspensão viral) e adicionar ao tanque através do funil de colheita, antes de colher as últimas 8 cestas. Isto permite limpar os restos de clorofórmio das mangueiras e evitar que se deteriore.

1.7.1.37 - Fechar o tanque, desligar o equipamento de colheita e aumentar a pressão a 10 lb/pol^2 no mesmo.

1.7.1.38 - Agitar vigorosamente a 80-100 rpm durante uma hora para que o clorofórmio destrua bem as membranas celulares.

1.7.1.39 - Parar a agitação e deixar sedimentar durante 20 horas a 4°C .

1.7.1.40 - Colher amostras para controles de pH, FC, título infectante e bacteriológico.

1.7.1.41 - Clarificar para o tanque de inativação (ver Procedimento, pág. 37).

1.7.2 Suspensão em tanques

Materiais

1.7.2.1 - Tanque com 380 litros de suspensão celular sedimentada durante 24 horas.

1.7.2.2 - Vírus-semente em frasco com conexão para tanque.

- 1.7.2.3 - Tampão glicocola em frasco com conexão para tanque.
- 1.7.2.4 - Funís.
- 1.7.2.5 - Tanque de tratamento estéril.
- 1.7.2.6 - Filtro Orion C40 estéril, preparado para filtrar meio de manutenção.
- 1.7.2.7 - Linha de meio estéril.
- 1.7.2.8 - Linha de transferência estéril.
- 1.7.2.9 - TPB.
- 1.7.2.10 - Seringas.
- 1.7.2.11 - Clorofórmio.
- 1.7.2.12 - Mangueira de conexão para filtrar meio.
- 1.7.2.13 - Meio de manutenção pH 7,6.

Procedimento

- 1.7.2.14 - Fazer uma contagem celular do sobrenadante para confirmar a existência de 50.000 cél/ml ou menos.
- 1.7.2.15 - Eliminar o meio sobrenadante pela saída correspondente inferior do tanque.
- 1.7.2.16 - Parar a circulação de água a 4°C na camisa e iniciar a de 37°C.
- 1.7.2.17 - Filtrar o meio de manutenção ao tanque, calculando o volume de acordo com a contagem celular obtida no momento de iniciar a sedimentação, de modo que fiquem $2,5 \times 10^6$ cél/ml no momento de resuspender novamente as células. Iniciar a agitação do tanque.
- 1.7.2.18 - Agitar a 110-120 rpm durante 30 minutos para resuspender as células e desfazer os grumos.
- 1.7.2.19 - Controlar o pH.
- 1.7.2.20 - Fazer uma contagem celular para confirmar o número de cél/ml e observar se houve muita mortalidade.

1.7.2.21 - Adicionar 2 ml de vírus-semente por litro de meio e regular a velocidade de agitação a 80 rpm.

1.7.2.22 - Realizar controles bacteriológicos de pH e de contagem celular cada 2 horas durante todo o processo.

1.7.2.23 - Em geral é conveniente passar ar na superfície (5-10 l/min) desde o início do cultivo para evitar que o pH baixe de 7,1-7,2. A medida que o pH baixar é necessário aumentar a passagem de ar na superfície e em profundidade cada 20 minutos.

1.7.2.24 - Pode-se reduzir a passagem de ar se o pH subir ou se mantiver devido à destruição celular.

1.7.2.25 - Quando a contagem celular é inferior a 100.000 cél/ml parar o cultivo esfriando a 4°C.

1.7.2.26 - Passar o antígeno pela linha de transferência ao tanque de tratamento.

1.7.2.27 - Colher amostras para controles de pH, FC, título infectante e controle bacteriológico.

1.7.2.28 - Circular água a 4°C pela camisa do tanque de tratamento.

1.7.2.29 - Adicionar clorofórmio pela entrada correspondente, na proporção de 10 ml por litro de antígeno.

1.7.2.30 - Aumentar a pressão no tanque a 10 lb/pol².

1.7.2.31 - Agitar vigorosamente a 80-100 rpm durante uma hora para que o clorofórmio destrua bem as membranas celulares.

1.7.2.32 - Parar a agitação e deixar sedimentar durante 20 horas a 4°C.

1.7.2.33 - Colher amostras para controle de pH, FC, títulos infectantes e controle bacteriológico.

1.7.2.34 - Clarificar para o tanque de inativação (ver Procedimentos, pág. 37).

1.7.3 Inativação

Materiais

- 1.7.3.1 - Hidrobromido de 2-bromo-etilamina (BEA)
 $\text{CH}_2 \text{ Br CH}_2 \text{ NH}_2 \text{ HBr}$ PM = 204,89
- 1.7.3.2 - Hidróxido de sódio PA PM = 39,997
- 1.7.3.3 - Tiosulfato de sódio PA
 $\text{Na}_2 \text{ S}_2\text{O}_3 \cdot \text{O}$ PM = 248,18
- 1.7.3.4 - Solução a 1% de β -Naftol violeta em água destilada (β -NV).
- 1.7.3.5 - Água destilada estéril a 37°C.
- 1.7.3.6 - Balança de precisão.
- 1.7.3.7 - Banho-maria a 37°C.
- 1.7.3.8 - Beakers de 500/ml.
- 1.7.3.9 - Provetas de 2 litros.
- 1.7.3.10 - Pipetas.
- 1.7.3.11 - Capela química com exaustor.
- 1.7.3.12 - Balão com sifão e conexão para o tanque de inativação.
- 1.7.3.13 - Agitador magnético.
- 1.7.3.14 - Barra magnética.

Procedimento

1.7.3.15 - Cálculo:

1.7.3.15.1 - O cálculo está baseado na preparação de uma solução de 0,1 M de BEA (20,5 g de BEA por litro) numa solução de 0,175 M de NaOH (7 g de NaOH por litro), para usar 15 ml de inativante (BEI) por cada litro de antígeno a ser tratado. Adicionar 0,5 ml de indicador β NV por litro de inativante.

1.7.3.15.2 - Ou seja, para 50 litros serão necessárias as seguintes quantidades:

a) $15 \times 50 = 0,75$ litros de água (750 ml)

b) $7 \times 0,75 = 5,25$ g de NaOH

c) $20,5 \times 0,75 = 15,4$ g de BEA

d) $0,5 \times 0,75 = 0,4$ ml de β NV

1.7.3.16 - Preparação:

1.7.3.16.1 - Pesar o NaOH e o BEA em beakers separados.

1.7.3.16.2 - Medir a água a 37°C e adicionar um pouco ao beaker com o NaOH, dissolver por agitação magnética e vaziar em balão. Repetir a operação duas vezes para dissolver bem e lavar o beaker. Adicionar a água restante ao balão e agitar bem.

1.7.3.16.3 - Dissolver o BEA na mesma forma, usando a solução de NaOH.

1.7.3.16.4 - Adicionar o indicador β NV e agitar. A solução ficará de cor violeta escura (pH 10,0-12,0).

1.7.3.16.5 - Fechar bem o balão com o sifão e colocar em banho-maria durante uma hora para favorecer a conversão de BEA em BEI, o que ocorre entre 15-45 minutos. Ao formar-se a BEI o indicador fica de cor alaranjada (pH 8,5-9,5).

1.7.3.17 - Inativação:

1.7.3.17.1 - Pre-aquecer o antígeno a 37°C antes de adicionar o inativante.

1.7.3.17.2 - Ligar o sifão à entrada do inativante do tanque e passar com pressão positiva.

1.7.3.17.3 - Agitar durante 24 horas a 37°C .

1.7.3.17.4 - Colher amostras para:

- a) controle bacteriológico;
- b) seqüência de inativação;
- c) FC;
- d) inocuidade.

1.7.3.17.5 - Ao terminar a inativação, adicionar solução de tiosulfato de sódio 1 M em quantidade suficiente para obter uma concentração final de 0,005 M (5 ml x litro de antígeno).

1.7.4 Preparação de vírus-semente

Materiais

1.7.4.1 - Seis garrafas-roller de 72 horas de crescimento com aproximadamente $3,5-5,0 \times 10^8$ células BHK-21 clone 13 linha VI.

1.7.4.2 - 1.200 ml de meio de manutenção com TRIS 30%, pH 7,6.

1.7.4.3 - Vírus de produção com título infectante maior ou igual a 7,5 DICT₅₀/ml. 2 ml por litro de inócuo.

1.7.4.4 - Bomba de vácuo e pressão.

1.7.4.5 - Tampão glicocola ou solução de bicarbonato de sódio a 7,5%.

1.7.4.6 - Solução de álcool iodado a 2%.

1.7.4.7 - Gase.

1.7.4.8 - Fluxo laminar.

1.7.4.9 - Beaker grande para eliminar o meio.

1.7.4.10 - Balões de vidro de 2 litros com sifão e barra magnética.

1.7.4.11 - Pipetas de 10 ml.

1.7.4.12 - Agitador magnético.

- 1.7.4.13 - Provetas.
- 1.7.4.14 - Campânula de inoculação.
- 1.7.4.15 - 30 frascos plásticos de vacina de 50 ml.
- 1.7.4.16 - Tampas e opérculos.
- 1.7.4.17 - Máquina de fechar opérculos.
- 1.7.4.18 - 10 frascos de penicilina vazios estéreis.

Procedimentos

- 1.7.4.19 - Controlar o pH do meio e corrigir a 7,6 se for necessário.
- 1.7.4.20 - Preparar a suspensão de vírus no meio de manutenção, adicionando 2,4 ml de vírus-semente.
- 1.7.4.21 - Fazer controle bacteriológico da suspensão em TPB.
- 1.7.4.22 - Desinfetar bem com álcool iodado a região da boca e tampas das garrafas.
- 1.7.4.23 - Eliminar o meio de cultivo.
- 1.7.4.24 - Inocular 200 ml de suspensão viral por garrafa-roller, usando o sifão com campânula de inoculação e a bomba.
- 1.7.4.25 - Incubar a 37°C durante 18-24 horas.
- 1.7.4.26 - Colher o vírus em balão com sifão e barra magnética e pôr sobre agitador magnético.
- 1.7.4.27 - Colher uma amostra para controles de pH, FC, título infectante e controle bacteriológico.
- 1.7.4.28 - Regular o pH a 7,6.
- 1.7.4.29 - Envasar em frascos de vacina e de penicilina.
- 1.7.4.30 - Opercular e congelar a -70°C em REVC0.

1.8 ESQUEMAS SEMANAIS DE PRODUÇÃO

Esquemas de produção

Nas páginas seguintes descrevem-se os três programas de produção seguidos no LARA-Campinas que podem servir de base para muitas outras variações.

Abreviaturas

MC	= meio de crescimento
MM	= meio de manutenção
T1	= tanque de cultivo de 120 litros
T2	= tanque de cultivo de 120 litros
T3	= tanque de cultivo de 450 litros
T4	= tanque de cultivo de 450 litros
T5	= tanque móvel de 300 litros
T6	= tanque de tratamento de 450 litros
T7	= tanque de inativação de 450 litros
AL	= área limpa
MEM-10	= meio essencial mínimo 10% soro bovino
TPB	= caldo de fosfato de triptosa

1.8.2 Tanque somente

DIA	T1	T2	T3	T4	Filtra meio	Balões	T5	T6	T7
S								Vírus tanque Filtra	Vírus tanque Inicia inativação
D	40 cél. 40 MC balão 80 rodar	40 cél. 40 MC balão 80 rodar							Vírus tanque Fim inat. Sedimenta
2ª	80 prontos a T4	80 prontos a T3	80 de T2 110 MC 190 rodar	80 de T1 110 MC 190 rodar	380 l MC a T3 e T4	80 l			Vírus tanque Passa AL
3ª			190 prontos 190 MC 380 rodar	190 prontos 190 MC 380 rodar	420 l a T3 e T4				
4ª			380 prontos Sedimenta a 40C	380 prontos Sedimenta a 40C			300 l de H ₂ O para lavar fil- tros		
5ª			Recebe 200 MM. Inocula virus tanque	Recebe 200 MM. Inocula virus tanque	450 l MM a T3				
6ª	40 cél. 40 MC 80 esfriar	40 cél. 40 MC 80 esfriar	Colheita Vírus tanque passa a T6	Colheita Vírus tanque passa a T6				Recebe virus tan- que de T3 e T4(400 l) Trata e sedimenta	

1.8.3 Roller e tanque

DIA	T1	T2	T3	T4	Filtro médio	Saivos	T5	T6	T7
S			Colheita Vírus tan- que Passa a T6					Vírus tanque Trata Sedimenta	
D		20 cél. 20 MC 40 rodar							
2ª	Esteril 20 cél. AL 20 MC balão 40 rodar	40 prontos 50 MC 30 rodar	Recebe 400 MM Inocula rollers		Esteril filtro Filtro 450 l MM	20 MM		Vírus tanque Filtro	Vírus tanque Inicia inativação
3ª	40 prontos 50 MC balão 40 rodar	90 prontos 100 MC 190 rodar	Esteril Recebe 300 MC		Esteril filtro Filtro 450 MC			Vírus ro- ller Trata se- dimenta	Vírus tanque Fim inativ. Sedimenta
4ª	90 prontos 10 reserva 10 cél. 45 MC balão 30 rodar	Esteril 95 cél. 45 MC balão 80 rodar	190 prontos 190 MC 380 rodar		Esteril filtro Filtro 550 l MC	320 MC		Vírus ro- ller Filtro	Vírus tanque Passa AL Vírus roller Inicia inativação
5ª	80 prontos Esfria	80 prontos Esfria Sedimenta	390 prontos Esfria Sedimenta				300 l de água para lavar fil- tros		Vírus roller Fim inativ. Sedimenta
6ª	80 frio 25 cél. 25 MC balão 100 semear 140 roller	80 frio 20 cél. 20 MC balão 40 esfria	Recebe 200 MM Inocula Vírus tanque	300 MC 115 cél. de T1 e T2 415 semear 1380 roller	Esteril filtro Filtro 220 MM a T4				Vírus roller Passa a AL

1.9 CONTROLES DE PRODUÇÃO

1.9.1 Resumo de controles

1.9.1.1 - Meios

Prefiltração:

- a) bacteriológico (titulação) do soro;
- b) bacteriológico (titulação) do meio total;
- c) pH.

Filtração:

- a) bacteriológico ao início, metade e final da filtração na saída do filtro;
- b) pH ao início e ao final da filtração;
- c) bacteriológico de balões mantidos durante 16 horas a 37°C depois da filtração;
- d) bacteriológico de tanques mantidos durante 16 horas a 37°C depois da filtração.

1.9.1.2 Cultivos celulares

Controles periódicos durante o cultivo em balões e tanques:

- a) pH;
- b) bacteriológico;
- c) contagem celular.

Garrafas-roller:

- a) visual, de contaminação;
- b) contagem antes de inocular.

1.9.1.3 Antígenos

Durante o cultivo em suspensão em tanque:

- a) contagem ao ressuspender em meio de manutenção;

- b) cada 2 horas durante o cultivo:
 - bacteriológico
 - pH
 - contagem celular.

Colheita:

- a) pH;
- b) bacteriológico;
- c) título infectante;
- d) FC. Titulação e tipificação.

Tratamento com cloroformio:

- a) pH;
- b) bacteriológico;
- c) título infectante;
- d) FC. Titulação e tipificação.

Clarificação:

- a) pH;
- b) bacteriológico;
- c) título infectante.

Inativação:

- a) seqüência de inativação;
- b) bacteriológico.

Inativado:

- a) pH;
- b) bacteriológico;
- c) FC. Titulação e tipificação;
- d) inocuidade;
- e) dose protetora cobaia 50%.
- f) quantificação de partículas 140S;
- g) clivagem de VP1.

Inocuidade:

a) FC. Tipificação do material da terceira passagem.

1.9.1.4 - Semente

a) pH;

b) bacteriológico;

c) título infectante;

d) FC. Titulação e tipificação.

1.9.2 Título infectante

Materiais

1.9.2.1 - Amostra de antígeno a ser titulado.

1.9.2.2 - Meio de manutenção.

1.9.2.3 - Grade de cultivo para tubos.

1.9.2.4 - Grade para tubos de diluição.

1.9.2.5 - 40 tubos com células BHK-21 clone 13, monocamada com 48 horas de incubação.

1.9.2.6 - 10 tubos de diluição.

1.9.2.7 - Pipetas de 1 ml, 5 ml e 10 ml.

1.9.2.8 - Propipeta.

1.9.2.9 - Seringa automática de 5 ml.

1.9.2.10 - Recipiente com gelo para preparar as diluições.

1.9.2.11 - Solução de bicarbonato de Na a 7,5%.

1.9.2.12 - Fluxo laminar.

Procedimentos

1.9.2.13 - Preparar diluições de 10^{-2} a 10^{-8} de antígeno, usando volumes de 4,5 ml de diluente (meio de manutenção) e 0,5 ml de antígeno.

OBSERVAÇÃO: Todos esses materiais devem estar em recipiente com gelo.

1.9.2.14 - Eliminar o meio de cultivo dos tubos.

1.9.2.15 - Inocular 0,1 ml por tubo de cada diluição, usando 5 tubos por diluição. A inoculação inicia-se pela diluição mais alta, continuando em forma descendente e usando a mesma pipeta. Inocular as diluições de 10^{-8} a 10^{-3} .

1.9.2.16 - Com uma seringa automática, adicionar 1 ml por tubo, seguindo a seqüência indicada no ponto 1.9.2.15.

1.9.2.17 - Incubar a 37°C e fazer leituras diárias durante 3 dias.

1.9.2.18 - Calcular o título do antígeno pelos métodos de Reed e Muench ou o de Kärber.

Exemplo de cálculo de título infectante. Método de Kärber

a) Fórmula:

$$\text{Log DICT}_{50} + L - d(S-0,5)$$

L = log negativo da menor diluição usada

d = diferença entre o fator de diluição

S = soma das proporções das provas positivas

b) Ordenação dos dados:

<u>Diluição de vírus</u>	<u>Proporção de tubos positivos</u>
10^{-1}	$4/4 = 1$
10^{-2}	$4/4 = 1$
10^{-3}	$4/4 = 1$
10^{-4}	$2/4 = 0,5$
10^{-5}	$1/4 = 0,25$
10^{-6}	$0/4 = 0$
	<u>3,75</u>

c) Cálculo

$$\begin{aligned}
 \text{Log DICT}_{50} &= L - d(S-0,5) \\
 &= -1 - 1(3,75-0,5) \\
 &= -1 - 1(3,75) \\
 &= -1 - 3,75 \\
 &= -4,25/0,1 \text{ ml} \\
 \text{Título} &= 10^{5,25}/1 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

1.9.3 EsterilidadeMateriais

1.9.3.1 - Caldo-triptosa-fosfato (TPB) em volumes de 50 ml em frascos de 100 ml com tampa de rosca.

1.9.3.2 - Seringas de 20 ml.

1.9.3.3 - Bico de Bunsen.

1.9.3.4 - Fluxo laminar.

1.9.3.5 - Álcool iodado.

1.9.3.6 - Gase.

1.9.3.7 - Sifões colhe-amostra de 250 ml.

1.9.3.8 - Mangueiras-tampa-sifão.

1.9.3.9 - Bomba manual de pressão.

Procedimentos- Meio de crescimento

1.9.3.10 - Flambando com bico de Bunsen, ligar sifões colhe-amostras à saída do filtro-Seitz e retirar uma amostra ao início da filtração, no meio e ao final.

1.9.3.11 - Levar ao fluxo laminar e inocular 1 ml de cada amostra em cada um dos 2 frascos de TPB.

1.9.3.12 - Incubar a 37°C durante 10 dias, observando diariamente.

1.9.3.13 - O meio filtrado aos tanques incuba-se a 37°C durante a noite, procedendo da seguinte forma para o controle bacteriológico:

- a) abrir a boca colhe-amostra do tanque;
- b) limpar a rolha de borracha com gase embebida em álcool iodado;
- c) colher a amostra com a seringa e inocular diretamente 1 ml em cada um de 2 frascos de TPB, tendo o cuidado de flambar durante a operação;
- d) incubar a 37°C durante 10 dias, observando diariamente.

1.9.3.14 - O meio filtrado aos balões incuba-se a 37°C durante a noite, procedendo da seguinte forma para o controle bacteriológico:

- a) ligar em forma estéril o sifão colhe-amostra ao sifão do balão;
- b) ligar a bomba manual de pressão ao mesmo e acionar para passar uma amostra ao sifão colhe-amostra;
- c) retirar em forma estéril flambando e tampando as saídas dos dois sifões;
- d) levar as amostras ao fluxo laminar e inocular 1 ml de cada amostra em cada um de 2 frascos de TPB;
- e) incubar a 37°C durante 10 dias, observando diariamente.

- Meio de manutenção

1.9.3.15 - Para filtrar aos tanques, proceder na mesma forma indicada para o meio de crescimento nos pontos 1.9.3.10 a 1.9.3.12.

1.9.3.16 - Caso se conserve meio em tanques, proceder da mesma forma indicada no ponto 1.9.3.13.

1.9.3.17 - Com o meio filtrado nos balões, proceder da mesma forma indicada no ponto 1.9.3.15.

- Cultivo de células em tanque ou em balões

1.9.3.18 - Sempre que se colher uma amostra para fazer contagem

celular e controlar o pH, realizar um controle bacteriológico procedendo da seguinte forma:

- a) abrir a boca colhe-amostra do tanque;
- b) limpar a rolha de borracha com gase embebida em álcool iodado;
- c) colher a amostra com a seringa e inocular diretamente 1 ml em cada um de 2 frascos de TPB, tendo o cuidado de flambar durante a operação;
- d) incubar a 37°C durante 10 dias, observando diariamente.

- Produção de antígeno em suspensão

1.9.3.19 - Durante a produção de antígeno em tanques, colher amostras cada 2 horas para fazer controle de contagem celular, pH e bacteriológico.

1.9.3.20 - Os controles bacteriológicos realizam-se na forma indicada no ponto 1.9.3.18.

- Processamento de antígenos

1.9.3.21 - Durante o processamento do antígeno colhem-se as seguintes amostras para o controle bacteriológico e outros controles de qualidade:

- a) depois da colheita, no tanque de tratamento com clorofórmio;
- b) depois do tratamento com clorofórmio neste mesmo tanque;
- c) depois da clarificação no tanque de inativação;
- d) durante a inativação conjuntamente com o controle de sequência de inativação;
- e) ao final da inativação, antes de passar à área limpa.

1.9.3.22 - Estes controles se realizam da mesma forma indicada no ponto 1.9.3.18.

1.9.4 Titulação de contaminação do meio pre-filtrado

Materiais

- 1.9.4.1 - Série de 20 tubos de cultivo celular com rosca, com 9 ml de caldo TPB cada um.
- 1.9.4.2 - Erlenmeyer de 200 ml para colheita de amostra.
- 1.9.4.3 - Fluxo laminar.
- 1.9.4.4 - Pipetas de 1 ml.
- 1.9.4.5 - Grade para tubos.

Procedimento

- 1.9.4.6 - Colher uma amostra de meio na saída do tanque de preparação, antes de entrar no filtro-Seitz.
- 1.9.4.7 - Levar a amostra ao fluxo laminar e inocular 1 ml da amostra em cada um de 2 tubos de TPB.
- 1.9.4.8 - Fazer diluições seriadas duplas de 1:10 até chegar a 10^{-10} , passando 1 ml de cada diluição previamente agitada e bem misturada.
- 1.9.4.9 - Incubar a 37°C durante 10 dias, observando diariamente.
- 1.9.4.10 - Calcular o título da contaminação. O grau de contaminação do meio pre-filtrado não deve ser superior a 10^3 por ml, já que uma contaminação maior compromete a capacidade de retenção das placas filtrantes (supersaturação) e é necessário aumentar a superfície filtrante mediante o aumento do número de placas clarificantes e esterilizantes.

1.9.5 Seqüência de inativação

Materiais

- 1.9.5.1 - 3 garrafas-roller com células BHK-21, clone 13 de monocapa ou suspensão, com 48-72 horas de incubação e com meio de manutenção.

1.9.5.2 - Seringas de 20 ml.

1.9.5.3 - Bico de Bunsen.

1.9.5.4 - Álcool iodado.

1.9.5.5 - Gase.

Procedimento

1.9.5.6 - Abrir a boca-colhe-amostra do tanque de inativação.

1.9.5.7 - Limpar a rolha de borracha com gase embebida em álcool iodado.

1.9.5.8 - Colher uma amostra de 10 ml com a seringa e inocular em forma estéril sobre o meio de uma garrafa-roller (não sobre as células porque elas se desprendem).

1.9.5.9 - Incubar a 37°C durante 5 dias na estante-roller.

1.9.5.10 - Corrigir o pH quando seja necessário.

1.9.5.11 - Realizar esta operação às 2 horas de iniciada a inativação, às 10 horas e às 20 horas.

1.9.6 Inocuidade

1.9.6.1 - A prova de inocuidade se realiza com as seguintes amostras de antígenos inativados:

- a) amostra colhida do tanque ao término da inativação;
- b) amostra colhida na área limpa de produção de vacina no momento de receber o antígeno;
- c) amostra da pre-mistura trivalente antes de produzir a vacina.

Materiais

1.9.6.2 - 18 garrafas-roller (6, 6 e 6) semeadas com 48 horas de diferença com células BHK-21 clone 13 de monocamada ou suspensão de 48 horas de crescimento. (Também podem-se usar 9 roller e 9 Roux para passar 3+3, 3+3 e 3+3).

- 1.9.6.3 - Solução salina balanceada de Earle's pH 7,4.
- 1.9.6.4 - Meio de manutenção pH 7,6.
- 1.9.6.5 - Rolhas de borracha especiais com respiradouro.
- 1.9.6.6 - Beaker de 1000 ml.
- 1.9.6.7 - Provetas de 500 ml.
- 1.9.6.8 - Pipetas de 10 ml.
- 1.9.6.9 - Fluxo laminar (ou bico de Bunsen).
- 1.9.6.10 - Álcool iodado.
- 1.9.6.11 - Gase.
- 1.9.6.12 - Solução de bicarbonato de sódio a 7,5%.
- 1.9.6.13 - Beakers de 250 ml.

Procedimento

- 1.9.6.14 - Colher uma amostra de 200 ml de antígeno e esfriar a 4°C, caso não seja processada imediatamente.
- 1.9.6.15 - Numerar as garrafas-roller de 1 a 6 e preparar o protocolo.
- 1.9.6.16 - Levar todos os materiais necessários ao fluxo laminar.
- 1.9.6.17 - Limpar bem as garrafas-roller com uma gase embebida em álcool iodado.
- 1.9.6.18 - Eliminar o meio de crescimento num beaker de 1000 ml.
- 1.9.6.19 - Adicionar + 100 ml de SSB de Earle's por garrafa-roller (+ 40 ml por garrafa-Roux), girar suavemente para lavar as células e eliminar. Repetir 2 vezes mais por garrafa.
- 1.9.6.20 - Adicionar 300 ml de meio de manutenção (100 ml por Roux).
- 1.9.6.21 - Inocular 10 ml de antígeno inativado por roller (5 ml por Roux) em cada uma de 5 garrafas, deixando a sexta como controle.

1.9.6.22 - Substituir as tampas de rosca por rolhas de borracha com respiradouro para permitir a eliminação do CO₂ e evitar a descida do pH.

1.9.6.23 - Incubar a 37°C por 48-72 horas. (As garrafas-Roux devem agitar-se periodicamente, durante as primeiras seis horas de incubação).

1.9.6.24 - Observar diariamente as monocapas para verificar a produção de alterações virais e reduções de pH, adicionando solução de NaHCO₃ a 7,5% se este último baixa de 7,0.

1.9.6.25 - Depois das 48-72 horas, as garrafas se agitam vigorosamente para desprender as células. (As garrafas-Roux devem ser congeladas e descongeladas para obter o mesmo resultado).

1.9.6.26 - Numerar uma nova série de 6 garrafas e passar 10 ml de suspensão celular da garrafa Nº 1 da primeira passagem para a Nº 1 da segunda passagem, e assim sucessivamente até chegar à Nº 6, repetindo os pontos 1.9.6.15 a 1.9.6.24.

1.9.6.27 - Repetir o procedimento por terceira e última vez.

1.9.6.28 - Ao terminar a incubação da terceira passagem fazer um "pool" com o meio das garrafas 1 a 5 e enviar à sorologia para a FC.

1.9.6.29 - Se algumas garrafas da 2ª ou 3ª passagem apresentam alterações, enviar amostras individuais à sorologia para ser estudadas por FC. As amostras da 1ª passagem sempre dão resultados positivos na prova de FC devido ao antígeno residual do primeiro inóculo.

2. ÁREA LIMPA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As técnicas de cultura de células se desenvolveram de antigos métodos de estudo de embriologia. No começo do século, se estabeleceu uma técnica reprodutível, demonstrando a continuidade de funções vitais de células *in vitro*.

Carrel, em 1913, descreveu a utilização do extrato de embrião para promover o crescimento de certas células, o que se poderia considerar como ponto de partida para as técnicas tradicionais de culturas celulares. Carrel também demonstrou a importância das técnicas assépticas, evitando contaminações bacterianas nas manipulações das culturas celulares.

O desenvolvimento de técnicas atuais foi grandemente incrementado por Earle e seus colaboradores no National Cancer Institute, demonstrando a habilidade das células para crescer diretamente sobre a superfície do vidro, em grandes quantidades, ou em propagar-se em suspensão. Na América do Sul, Chile foi o primeiro país a estabelecer técnicas de culturas celulares para o diagnóstico da febre aftosa e da poliometite em 1952, no Instituto Bacteriológico do Ministério da Saúde.

A cultura de células animais *in vitro* é possível quando se reproduzem as condições mais aproximadas do crescimento *in vivo*. Essas condições são basicamente do tipo ambiental: temperatura, pressão osmótica, concentração hidrogeniônica, presença de íons orgânicos e de metabolitos orgânicos essenciais.

Os meios de cultura para células são uma combinação de sais minerais, aminoácidos e vitaminas, quimicamente definidos e equilibrados. Incorpora-se Vermelho-Fenol como indicador de pH. A necessidade desse componente é geralmente comum a todos os tipos de células. O crescimento e a sobrevivência das células *in vitro* requer a presença de determinantes macromoleculares, que são obtidos de soro animal utilizado. O ambiente controlado deve ter um pH adequado para o crescimento de células,

que geralmente varia entre 7,2 e 7,4. A maior parte dos meios conta com um sistema tampão fosfato/bicarbonato, para controlar as variações de pH, pois as células metabolizam produzindo ácidos que baixam o pH.

A temperatura para o crescimento ótimo das células de mamíferos é de 37°C.

2.1.1 Segurança biológica

A segurança biológica se refere ao controle dos elementos microbianos em um determinado ambiente. Sua aplicação no laboratório, onde são manipulados agentes patogênicos, significa proteger tanto o pessoal quanto o experimento.

As causas mais freqüentes de infecção no laboratório são:

- a) aspiração oral, acidental, de material infeccioso, através de uma pipeta;
- b) inoculação acidental com uma seringa e agulha;
- c) mordeduras de animais;
- d) aspiração de aerossóis;
- e) acidentes com centrífugas.

2.1.2 Procedimentos de segurança

2.1.2.1 - Usar pipetas de segurança com bulbos ou tubos de borracha ou com pipeteadores especiais como a propipeta. Fica proibida a pipetagem bucal.

2.1.2.2 - Usar câmaras de fluxo laminar vertical é obrigatório quando são ou podem ser gerados aerossóis perigosos para a saúde humana.

2.1.2.3 - Descontaminar o ambiente com algum desinfetante químico eficaz, limpando as mesas após completar as operações de trabalho com materiais infecciosos ou ao final de cada dia.

2.1.2.4 - Materiais infecciosos, tóxicos, corrosivos, explosivos ou de qualquer outro risco, devem ser tratados por autoclave,

neutralizados ou sofrer qualquer outro processo que os deixe livres de perigo antes de ser descartados em pias ou em linhas de esgoto.

2.1.2.5 - Deve-se usar roupas especiais para trabalhar na área do laboratório. Em restaurante, biblioteca e outras áreas não infectadas deve-se usar roupas limpas.

2.1.2.6 - Materiais de vidro devem ser descartados em depósitos especiais contendo algum desinfetante químico. Não deixar materiais infectados ou tóxicos no laboratório.

2.1.2.7 - No laboratório, deve-se manter as mãos afastadas da boca, nariz, olhos e do rosto, evitando-se fumar, comer ou beber.

2.1.2.8 - Tomar as precauções necessárias durante a centrifugação de materiais infectados.

2.1.2.9 - Evitar ao máximo, gerar aerossóis

2.1.2.10 - Cadáveres de animais, assim como ovos embrionados devem ser colocados em sacos plásticos especiais e incinerados.

2.1.3 Lavagem, preparo e esterilização de material

O pessoal deve usar roupas especiais de trabalho. Para manipular substâncias corrosivas, recomenda-se o uso de luvas e aventais de borracha. É recomendável usar luvas de amianto para o manejo de fornos-Pasteur e de autoclaves.

De modo nenhum deve ser usado qualquer material lavado e preparado em outras áreas de laboratórios que trabalham com agentes contaminantes, sejam eles biológicos, químicos ou físicos.

2.1.3.1 - Vidraria

A cultura de células exige um tratamento especial da vidraria, a qual não deve ser de uso comum a outros laboratórios.

Os frascos usados em culturas celulares ou com meios de cultura, devem ser enxaguados, imediatamente após o uso, para prevenir a coagulação de proteínas nas paredes.

Lavagem

- a) a vidraria é deixada de molho em solução a 1% de detergente durante uma noite (EVENT). Todo material novo se deixa de molho em solução a 2% de detergente durante 3 a 4 dias. A solução de detergente deve ser trocada uma vez por semana ou sempre que se observar suja;
- b) retirar do detergente e escovar bem para eliminar detritos, inclusive restos celulares, aderidos às paredes. Usar escovas apropriadas ao tamanho do frasco, e em boas condições para não arranhar o vidro;
- c) enxaguar + 5 vezes com água comum;
- d) enxaguar + 5 vezes com água desmineralizada;
- e) enxaguar com água bidestilada ou de osmose reversa, pelo menos uma vez;
- f) após eliminar excesso de água, secar em forno-Pasteur a 150°C por 30 minutos.

Preparo

O material a preparar deve estar seco e frio.

A forma de preparar o material tem grande importância sobre a facilidade de seu emprego posterior e a conservação da esterilidade por maior tempo. Em geral, as partes abertas são cobertas com papel-alumínio de espessura 0,04 mm, o qual é protegido com papel-Kraft, amarrando-se com barbante de 12 fios (R-44 Colli S.P.).

Os tubos de ensaio para cultura de células são colocados em caixas especiais, com a boca dos tubos voltada para o fundo da caixa.

As seringas hipodérmicas são preparadas em tubos de ensaio ou de hemólise, com papel-alumínio no fundo do tubo para proteger a ponta da agulha.

Esterilização

Esterilizar em forno-Pasteur a 180°C durante 2 horas.

2.1.3.2 - Pipetas

2.1.3.2.1 - As pipetas usadas são recebidas em cilindros com solução de detergente a 1%.

2.1.3.2.2 - Retirar a proteção de algodão com pressão de água (rolha perfurada de forma especial, de modo a adaptar-se à torneira e à ponta da pipeta), o que já significa um enxágue em água comum.

2.1.3.2.3 - Enxaguar com água desmineralizada com 10 ciclos no cilindro lavador de pipetas.

2.1.3.2.4 - Secar em forno-Pasteur a 150°C por 30 minutos.

2.1.3.2.5 - Após esfriar, colocar algodão hidrófobo (não absorvente) no bocal.

2.1.3.2.6 - Separar por capacidade e graduação, em caixas de aço inox. As pipetas também podem ser envoltas em papel-Kraft, individualmente.

2.1.3.2.7 - Esterilizar em forno-Pasteur a 180°C durante 2 horas.

2.1.3.3 - Tampas de rosca e/ou de borracha

2.1.3.3.1 - Deixar as tampas novas de molho em detergente a 2% durante 1 semana.

2.1.3.3.2 - Deixar as tampas já usadas de molho em detergente a 1% durante a noite.

2.1.3.3.3 - Enxaguar com água corrente.

2.1.3.3.4 - Enxaguar ± 5 vezes com água desmineralizada;

2.1.3.3.5 - Secar em temperatura ambiente ou a 37°C.

2.1.3.3.6 - As tampas pequenas são separadas por número em frascos de boca larga tapados com papel-Kraft.

2.1.3.3.7 - As tampas grandes são embrulhadas em papel-Kraft, individualmente.

2.1.3.3.8 - Esterilizar em autoclave a 121°C durante 1 hora.

2.1.3.4 - Balões com sifões e mangueiras

2.1.3.4.1 - Retirar os sifões e mangueiras para lavar em separado. Os filtros de lã de vidro não devem ser molhados.

2.1.3.4.2 - Deixar os balões, sifões e mangueiras de molho durante a noite em detergente a 1%.

2.1.3.4.3 - Lavar bem com água corrente, por dentro e por fora.

2.1.3.4.4 - Enxaguar com água desmineralizada.

2.1.3.4.5 - Secar em temperatura ambiente ou a 37°C.

2.1.3.4.6 - Instalar os sifões e mangueiras nos balões (com barra magnética adequada), instalar os filtros e verificar tudo.

2.1.3.4.7 - As mangueiras soltas são preparadas com papel-alumínio nos extremos e embrulhadas em papel-Kraft.

2.1.3.4.8 - As mangueiras-tampa soltas, são embrulhadas em papel-Kraft individualmente.

2.1.3.4.9 - Os filtros de lã de vidro, para sifões, são embrulhados individualmente em papel-Kraft.

2.1.3.4.10 - Esterilizar em autoclave a 121°C durante 1 hora.

2.1.4 Contagem de células cultivadas

2.1.4.1 - A contagem das células vivas é facilitada pelo uso de corantes como azul de tripan a 0,4% ou eosina a 2%, pois coram as células mortas.

2.1.4.2 - Usa-se um hemocitômetro (Fucks Rosenthal ou Spencer Bright Line) fazendo a contagem nas áreas destinadas a glóbulos brancos. A suspensão celular deve estar adequadamente diluída e dispersada. A suspensão celular é misturada em partes iguais com a solução de eosina a 2%.

2.1.4.3 - Na observação microscópica usa-se objetiva 10 ou 16 mm que abrange um quadrado grande que contém 16 quadrados pequenos. Contam-se as células viáveis, não coradas pela eosina, nos quatro quadrados grandes.

2.1.4.4 - O resultado, em termos de quantidade de células por ml de suspensão, se obtém desenvolvendo a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ células contadas}}{\text{N}^{\circ} \text{ quadrados contados}} \times \text{fator de conversão da câmara} \times \text{fator de diluição} = \text{células/ml}$$

Usando um hemocitômetro Bright Line, improved Neubauer, teremos:

Um quadrado grande tem 1 mm² de área e 0,1 mm de profundidade. O volume é de 1 mm² x 0,1 mm = 0,1 mm³.

O fator de conversão da câmara, para 1 ml é 10.000 porque 0,1 mm³ x 10.000 = 1 cm³ = 1 ml ou seja, o número de células contidas em 1 ml é 10.000 vezes o número das contidas em 0,1 mm³.

Exemplo:

Se a contagem de um quadrado grande é de 240 células e desenvolvemos a fórmula, temos:

$$\frac{240}{4} \times 10.000 \times 2 = 1.200.000 \text{ cél/ml}$$

Simplificando, é possível multiplicar o número de células contadas por 5.000 (10.000 x 2 : 4 = 5.000)

$$240 \times 5.000 = 1.200.000 \text{ cél/ml.}$$

2.1.5 Parâmetros do crescimento celular

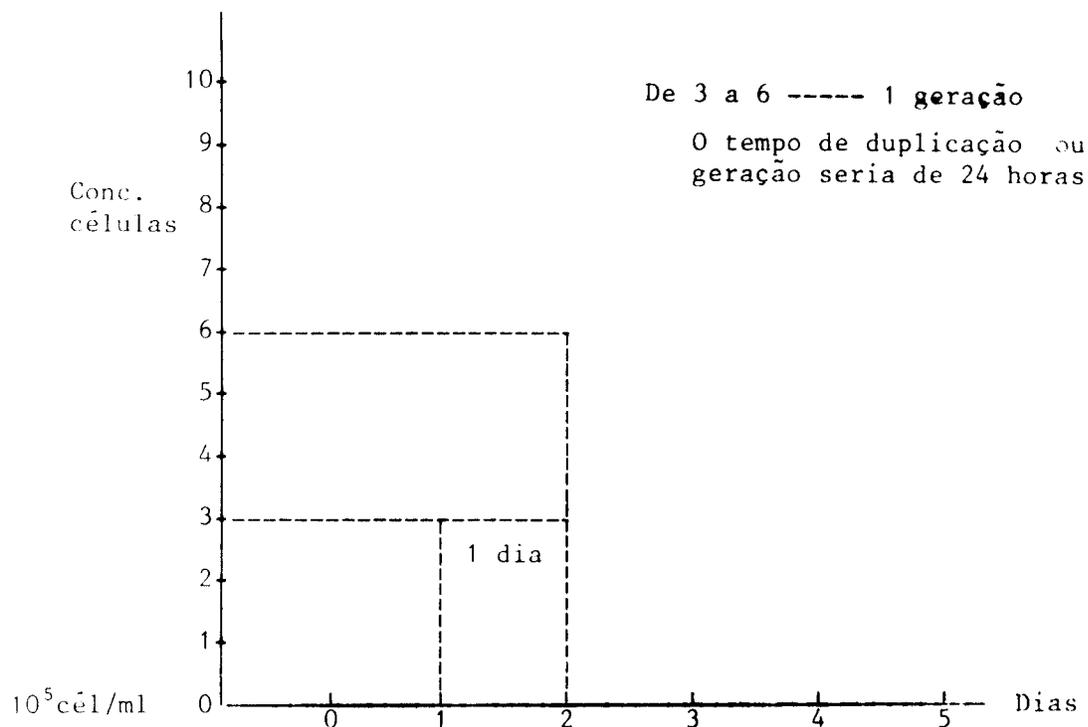
A maioria das células de mamíferos crescem bem sobre uma superfície plana inerte.

Três parâmetros são usados para definir o crescimento destas células. Cada parâmetro é dependente do meio de cultivo, especialmente da concentração de soro.

Os parâmetros são os seguintes: 1 eficiência do plaqueamento; 2 densidade de saturação e 3 tempo de duplicação (doubling time).

2.1.5.1 - Eficiência de plaqueamento é o número de células que cresce em colônias por 100 células inoculadas, quando o inóculo é disperso o suficiente para permitir o crescimento de colônias separadas. É uma medida de autonomia celular, visto que cada colônia é descendente de uma célula que se dividiu à distância de suas vizinhas.

2.1.5.2 - Tempo de duplicação ou tempo de geração é o tempo que leva um cultivo para dobrar em número sua população celular. Se todas as células estão em divisão, este tempo é uma medida da eficiência metabólica de toda a população celular. Quando todas as células estão em divisão, o número de células aumenta exponencialmente com o tempo. Então o tempo de geração pode ser determinado pelo traçado de uma curva de log do número de células versus tempo.



2.1.5.3 - Densidade de saturação é o número máximo de células por cm², que uma linha celular é capaz de alcançar. A maioria das linhas celulares normais possuem uma densidade de saturação estável, ou seja, chega a um ponto que as células não mais se multiplicam. No caso, de linhas celulares malignas, que crescem por divisão até que a camada se desprenda, a morte celular sobrevem pelo esgotamento dos elementos nutritivos do meio, ou porque estes não podem se difundir até as camadas celulares inferiores, que morrem. O efeito do soro sobre a densidade de saturação é especialmente drástico. A densidade de saturação é medida diretamente pela média de várias contagens de células por placa.

2.1.6 Ciclo celular

O espaço de tempo entre duas divisões mitóticas sucessivas de uma célula mamífera é denominado interfase. É um período de síntese intensa durante o qual a célula passa por uma sequência de eventos metabólicos que culmina no processo mitótico e na formação de duas células filhas. Um dos eventos mencionados é a síntese do ADN, que é um processo descontínuo. Esta descontinuidade forma a base para a nomenclatura que define três principais etapas da interfase:

G1, fase pos-mitótica que precede o período de síntese do ADN.

S, período de síntese do ADN.

G2, fase pré-mitótica, após a síntese do ADN.

Estas três etapas mais o período de mitose M, constitui o que se denomina ciclo celular.

2.1.7 Populações clonais

2.1.7.1 - Quando as células de um órgão intacto ou de um tumor são transplantadas para condições *in vitro*, pela primeira vez, diz-se que estão em cultivo primário.

2.1.7.2 - Se estas células de cultivo primário proliferam e são subcultivadas, representam uma estirpe celular.

2.1.7.3 - Depois de clonar uma estirpe e estabelecer um cultivo permanente, chega-se a uma linha celular.

2.1.7.4 - Existem métodos para isolar uma única célula em cultivo, de um determinado tipo dentro de uma população mista, sendo os descendentes da célula clonada uma população clonal.

2.1.7.5 - Já foram desenvolvidos vários métodos para clonagem de células:

2.1.7.5.1 - Crescimento em agar semi-sólido.

2.1.7.5.2 - Uso de uma camada celular previamente irradiada (as células seguem metabolizando mas não se dividem, e ajudam o crescimento das células isoladas).

2.1.7.5.3 - Plaqueamento de células sobre fragmentos de lamínulas.

2.1.7.5.4 - Cultivos em tubos capilares, em gotas de meio.

2.1.7.5.5 - Uso de pequenos cilindros para selecionar colonias celulares.

2.1.7.5.6 - Diluições que são cultivadas em microplacas.

Em qualquer dos métodos, o essencial é colocar as células em uma densidade suficientemente baixa para permitir o isolamento de células separadas e prover um ambiente em que possam proliferar.

2.1.7.6 - Clonagem de linhas celulares (em fragmentos de lamínula):

2.1.7.6.1 - Cortar lamínulas em pequenos fragmentos de 2,5 a 3,0 mm².

2.1.7.6.2 - Lavar os fragmentos em solução normal de HCl por 10 minutos em temperatura ambiente, enxaguar bem em água destilada e depois em etanol de 95% a 100%.

2.1.7.6.3 - Secar em forno e esterilizar em placa petri de 60 mm.

2.1.7.6.4 - Os fragmentos são espalhados de forma a cobrir todo o fundo da placa, antes de receber a semeadura de células.

2.1.7.6.5 - As células são diluídas em um meio de crescimento

para uma densidade aproximada de 200 cél/ml para conter 5 ml com 1.000 células em cada placa.

2.1.7.6.6 - Incubar as placas em estufa de CO₂ por 7 a 10 dias.

2.1.7.6.7 - O exame microscópico das placas revelará que os fragmentos contêm colônias de 100 a 150 células.

2.1.7.6.8 - Escolhem-se fragmentos que contêm colônia única, que são transferidos com pinça estéril para placas menores com meio de crescimento condicionado (meio em que já proliferaram outras células, e que foi refiltrado).

2.1.7.6.9 - As placas pequenas podem ser agitadas diariamente para propiciar o espalhamento das células da colônia sobre a superfície do vidro.

2.1.7.6.10 - Quando o cultivo estiver confluyente, transferir para frasco maior e manter o cultivo como uma linha celular.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
LABORATÓRIO REGIONAL DE APOIO ANIMAL - LARA/CAMPINAS-SP.
CENTRAL DE MEIO DE CULTURA

MEIO EAGLE BHK CRESCIMENTO PARA SUSPENSÃO

Data...../...../..... Lote..... Partida.....

Preparação	P/.1.000 ml	P/..... ml
Eagle MEM, Gibco, 410 - 1.100	9,526 g	.
Glicose anidra	3,150 "	.
Triptose PO ₄ (T.P.B.)	2,950 "	.
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	2,200 "	.
Vitaminas 250 x, stock	1,8 ml	.
Fe(NO ₃) ₃ . 9H ₂ O, stock	0,09 "	.
Soro bovino, lote.....	80,0 "	.
H ₂ O desmineralizada, q.s.p.	1.000 "	.
Antibióticos: Sim () Não ()	P/.1.000 ml	P/..... ml
Penicilina G Potássica	100.000 UI/l.	.
Sulfato de neomicina	0,223 g/l.	.
Fungizone	0,0025 g/l.	.
Sulfato de polimixina B	40.000 UI/l.	.
pH..... inicial	pH..... final	

Filtração: Área limpa () Área de antígeno ()
 Millipore () 142 () 293 () Seitz () 20x20 () 40x40 ()
 Pré-filtros: AP 15/257 () AP 15/293 () AP 25/257 () AP 32/257 ()
 Membranas: AW 0,30 () PHWP 0,30 () GSWP 0,22 ()
 Placas Seitz: K₂ () EK () EKS () EKS 1 () EKS 2 ()
 Acondicion.:..... Balões com aparaturas de..... ml Tanque ()

Preparado por:

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
 LABORATÓRIO REGIONAL DE APOIO ANIMAL - LARA/CAMPINAS-SP.
 CENTRAL DE MEIO DE CULTURA

MEIO EAGLE BHK MANUTENÇÃO DE VIRUS

Data...../...../..... Lote..... Partida.....

Preparação	P/.1.000 ml	P/.....ml
H ₂ O desmineralizada	700 ml	.
MEM, Gibco, 410 - 1.100	5,999 g	.
Glicose anidra	2,205 "	.
NaHCO ₃	1,540 "	.
T.P.B.	2,950 "	.
Vitaminas 250 x, sol. stock	1,26 ml	.
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O, sol. stock	0,063 "	.
Solução de tris	300 "	.
Solução de tris	P/.1.000 ml	P/.....ml
H ₂ O desmineralizada	300 ml	.
Tris-hidroximetilaminometano	7,260 g	.
HCl concentrado	3 ml	.
pH..... da sol. de tris		
Antibiótico: Sim () Não ()	P/.1.000 ml	P/.....ml
Penicilina	100.000 UI/l. .	
Sulfato de neomicina	0,150 g .	
Fungizone	0,0025 g .	
Polimixina B	40.000 UI/l. .	
Filtração: Área limpa ()		Área de antígeno ()
Millipore () 142 () 293 ()		Seitz () 20x20 () 40x40 ()
Pré-filtros: AP 15/257 () AP 15/293 () AP 25/257 () AP 32/257 ()		
Membranas: AW 0,30 () PHWP 0,30 () GSWP 0,22 ()		
Placas Seitz: K ₂ () K ₅ () EK () EKS () EKS 1 () EKS 2 ()		
Acondicion.:..... Frascos C/. ml cada		Tanque ()

Preparado por:

2.2 USO DE ANTIBIÓTICOS EM CULTIVO CELULAR

Diversos antibióticos são utilizados em cultivos celulares, para inibir possíveis contaminações durante a manipulação.

Para controlar contaminações por fungos e leveduras, usamos Fungizon (Anfotericina B). Para o controle das contaminações bacterianas usamos diferentes antibióticos como penicilina, estreptomina, neomicina, polimixina, etc.

2.2.1 Penicilina

Utiliza-se penicilina G potássica cristalina, que é um agente antimicrobiano não tóxico para os cultivos celulares e efetivo para o controle de bactérias gram-positivas, em concentrações de 0,2 a 1,5 unidades por mililitro (U/ml). As bactérias gram-negativas são sensíveis à penicilina em concentrações maiores, sendo frequentemente necessárias concentrações de 5U/ml.

A conservação do pó à temperatura ambiente é possível, porém é melhor a 4°C por períodos maiores de 2 anos.

A vida média da penicilina no meio de cultivo com pH 7,5 incubado a 37°C é de 60 horas.

Experimentos com células L NCTC 929, fibroblastos de camundongo, HeLa, sarcoma de camundongo e outras linhas celulares em meio Waymouth indicaram que a metade da penicilina é inativada após 2 dias de incubação a 37°C. Os produtos da degradação, ácido penicílico e ácido peniciloico, não têm efeito tóxico na proliferação de células em cultivo, em concentração de 100 mcg/ml.

Os meios de cultivo podem ser suplementados com 100 a 200 unidades de penicilina G potássica por mililitro. A solução-estoque é preparada 100 a 1000 vezes concentrada e diluída no momento da preparação do meio de cultivo. Adicionar água destilada estéril ao pó estéril, ou esterilizar a solução por filtração esterilizante (Millipore GS - 0,22 µm). A solução estéril pode ser mantida em refrigeração ou congelada a -20°C.

2.2.2 Estreptomicina

O sulfato de estreptomicina e o sulfato de dehidro-estreptomicina são usados em cultivos celulares para controlar contaminações por bactérias gram-negativas.

A estreptomicina é produzida por estirpes selecionadas do *Streptomyces griseus*. O sulfato de estreptomicina em pó é estável a temperatura ambiente por quatro semanas sem perda apreciável de sua potência; pode ocorrer descoloração da solução sem que haja redução de atividade.

Soluções de sulfato de dehidro-estreptomicina são estáveis a 37°C por meses em pH adequado nos meios de cultivo.

A vida média da estreptomicina em meio de cultivo a 37°C é de quatro dias e a vida média da dehidro-estreptomicina é de até trinta dias nas mesmas condições.

A estreptomicina não é tóxica para as células em cultivo, nas concentrações recomendadas de 100 a 200 mcg/ml de meio de cultivo.

A solução-estoque pode ser preparada 100 a 1000 vezes concentrada a partir do pó estéril ou esterilizada por filtração e conservada em refrigeração.

Observações: Não usar nas culturas de BHK para produção de vacina antiaftosa.

2.2.3 Fungizon - Anfotericina B

É um agente anti-fúngico produzido pelo *Streptomyces nodosus*, usado em cultivos celulares para controlar contaminações por fungos e leveduras.

Concentrações de 20 mcg/ml (0,020 mg/ml) suprimem o crescimento de *Candida*, *Rhodotorula* e *Aspergillus* em cultivos de rim de macaco em monocamada. Esta concentração não afeta os cultivos em monocamada e em suspensão, de numerosas linhas celulares como BHK, HeLa, KB, rim bovino (AFIP), L, etc.

O pó deve ser conservado em refrigeração, protegido da luz. As soluções concentradas podem ser armazenadas a 4°C por várias semanas sem perda de sua potência.

Se a solução de Fungizon é armazenada por mais de duas semanas a 4°C, um pequeno precipitado pode ocorrer; este precipitado se dissolve quando a solução é aquecida a 37°C.

Como o Fungizon é solúvel no meio de cultivo, pode ser adicionado antes da filtração esterilizante, o que não era possível com a micostatina. O Fungizon é inativado em meio de cultivo a 37°C em período superior a uma semana.

A solução-estoque é obtida por adição de 20 ml de água destilada estéril ao frasco com 50 mg. Utiliza-se 1 ml desta solução-estoque (2,5 mg) para cada litro de meio de cultivo. A concentração final no meio é 2,5 mcg/ml (0,0025 mg/ml).

2.2.4 Gentamicina

É um antibiótico ativo contra uma grande variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Também pode controlar micoplasmas.

A gentamicina suporta autoclavação e é estável a 37°C ao menos por 15 dias sem ser afetada pela presença de soro.

As concentrações recomendadas são de 50 a 100 mcg/ml.

2.2.5 Neomicina

É ativa contra um grande número de germes que são resistentes à penicilina e estreptomicina, sendo particularmente útil em combater as formas L das bactérias.

O pó deve ser mantido sob refrigeração. A solução-estoque pode ser conservada por semanas a -20°C.

Utilizam-se concentrações de 50 a 100 mcg/ml.

2.2.6 Aureomicina

Pode ser usada em substituição à penicilina e estreptomicina, por seu amplo espectro sobre germes gram-positivos e gram-negativos. Cultivos celulares mantidos com aureomicina permaneceram livres de micoplasmas por mais de 2 anos.

Reconstituir 500 mg de aureomicina Lederle em 50 ml de água destilada estéril a 37°C. Conservar congelada a -20°C até usar.

Usam-se 5 ml da solução-estoque por litro de meio de cultivo. A concentração final recomendada é de 50 mg por litro.

2.2.7 Polimixina B

Utilizada por seu amplo espectro contra germes gram-positivos e gram-negativos.

Geralmente se emprega a forma de sulfato de polimixina B.

O pó é conservado vários anos em refrigeração. A solução-estoque pode ser conservada a 4°C se usada na mesma semana, caso contrário conservar congelada a -20°C.

Usa-se em concentrações de 50 a 100 mcg/ml nos meios de cultivo.

2.2.8 Determinação do volume a usar

A fórmula é a seguinte:

$$\frac{\text{volume do meio} \times \text{Unidades ou mcg de antibióticos a usar}}{\text{Unidades ou mcg da solução-estoque}}$$

Exemplo: Penicilina, solução-estoque 100.000 U/ml

$$\frac{236 \text{ ml} \times 200 \text{ U}}{100.000 \text{ U}} = 0,472 \text{ ml}$$

A tabela abaixo resume o assunto e mostra as concentrações de antibióticos recomendados:

ANTIBIÓTICOS USADOS EM CULTIVOS CELULARES

Efetivo sobre	Nome	Concentração recomendada
Bactérias	Ampicilina	100 mcg/ml
	Aureomicina	50 mcg/ml
	Cloramfenicol	5 mcg/ml
	Eritromicina	100 mcg/ml
	Estreptomicina	100 mcg/ml
	Gentamicina	50 mcg/ml
	Kanamicina	100 mcg/ml
	Lincomicina	100 mcg/ml
	Neomicina	50 mcg/ml
	Polimixina B	50 mcg/ml
	Penicilina	100 U.O./ml
	Tetraciclina	10 mcg/ml
Viomicina	50 mcg/ml	
Fungos e leveduras	Anfotericina B	2,5 mcg/ml
	Nistatina	50 mcg/ml
Micoplasmas	Eritromicina	100 mcg/ml
	Gentamicina	50 mcg/ml
	Kanamicina	100 mcg/ml
	Tetraciclina	10 mcg/ml

1 mcg = 0,001 mg

1 mcg = 1 μ g

2.3 SORO ANIMAL EM CULTIVOS CELULARES

Todas as partidas de soro devem ser controladas em meios microbiológicos apropriados para bactérias, fungos e micoplasmas.

Também se determina a capacidade de promover crescimento celular, utilizando três linhas celulares. Em geral usa-se a uma concentração de 10% no meio de cultivo. As provas de controle são feitas em três passagens sucessivas, observando-se a toxicidade, deficiência de crescimento ou mudanças morfológicas.

A identificação da espécie doadora do soro é possível por eletroforese em acetato de celulose.

O conteúdo da hemoglobina pode ser determinado pelo método de Fleming modificado (Clinical Chem, v-12:67 1965).

O conteúdo protéico é determinado pelo método de Buiet.

A osmolaridade e pH devem estar nos limites normais.

O soro bovino deve estar livre de vírus adventícios, BVD, IBR e PI3.

O soro equino deve estar livre de vírus de anemia infecciosa.

2.3.1 Obtenção de soro bovino

Coletar soro em um matadouro higiênico e sob controle sanitário oficial.

Utilizar tachos de alumínio, de boca larga, com 10 litros de capacidade, com penicilina e neomicina em concentrações de 100.000 U e 0,15 g/litro de sangue, respectivamente.

Deixar coagular e cortar o coágulo em pedaços de aproximadamente 5 cm de lado. Decantar para vasilhames plásticos perfurados como uma peneira, deixando escorrer o soro para outro vasilhame durante a noite em câmara fria.

Centrifugar em Alfa Laval contínua, usando bico de 7 mm a 7.000 rpm.

Inativar por aquecimento a 56°C sob agitação.

Ensacar em plástico e congelar a -20°C ou filtrar (EKS1 ou EKS+AP25+PH) e congelar a -20°C.

Em todo o processo de preparação deve-se empregar o menor tempo possível para evitar contaminações bacterianas e suas toxinas, assim como a desnaturalização de certas proteínas.

Cada partida de soro deve ser controlada em sua esterilidade e em sua capacidade de promover o crescimento das células usadas no laboratório, realizando três cultivos sucessivos, fazendo contagem celular, empregando uma partida já conhecida como padrão de referência (ver protocolo anexo).

2.3.2 Tratamento com PEG

O tratamento do soro com polietilenoglicol não melhora a capacidade de promover o crescimento celular, apenas possibilita o uso de soro bovino coletado em matadouro, proveniente de animais com anticorpos vacinais, em provas de titulação ou controle de inocuidade, por promover a retirada dos anticorpos do soro.

Solução-estoque de PEG-Polietilenoglicol 6000 ou 8000 (Fisher Scientific Co. P.155).

PEG	800 gramas
Salina 0,85%	1 litro

Autoclavar a 121°C por 20 minutos.

Esfriar e conservar em refrigeração.

Se houver formação de um sedimento, dissolver em banho-maria a 60°C.

Sob agitação adicionar 170 ml da solução-estoque de PEG a cada litro de soro a tratar.

Deixar em agitação a 4°C durante uma hora ou até durante a noite.

Deixar sedimentar a 4°C durante uma hora ou até durante a noite.

Decantar filtrando por gase.

Esterilizar por filtração por membrana 0,22 µm.

Congelar a -20°C.

PROTOCOLO CONTSORO

CONTROLE DE SORO EM CÉLULAS

Soro Padrão Lote:
CélulasData coleta:
Meio Lote:

Data	N. Pass.	Cont. Inic.	Cont. Fin.	Observações

Conclusão:

Soro em Prova:
Células:Data Coleta:
Meio Lote:

Data	N. Pass.	Cont. Inic.	Cont. Fin.	Observações

Conclusão:

Soro em Prova:
Células:Data Coleta:
Meio Lote:

Data	N. Pass.	Cont. Inic.	Cont. Fin.	Observações

Conclusão:

2.4 CONTAMINAÇÃO DE CULTIVOS CELULARES COM MICOPLASMAS

Os micoplasmas, também chamados de organismos semelhantes a pleuropneumonia, PPL0, são procariontes altamente pleiomórficos pois são desprovidos de parede celular. Possuem uma membrana celular de três camadas e espessura de 75 - 100 angstrom. O tamanho varia de 1250 a 3000 angstrom, aproximadamente o mesmo tamanho dos poros de 0,22 μ m das membranas filtrantes utilizadas para esterilizar meios de cultivo celular.

2.4.1 Efeitos sobre os cultivos celulares

São variáveis. Em muitos casos não se observam modificações no crescimento ou na morfologia celular e cultivos aparentemente sadios podem conter 107 micoplasmas por mililitro.

Já foram comunicados efeitos similares a infecções virais. Os micoplasmas podem parecer vírus com respeito a filtrabilidade, sensibilidade ao éter, hemaglutinação, hemadsorção, interferência viral, resistência aos antibióticos, resposta antigênica, produção de placas, etc.

Destruição de arginina, um aminoácido essencial, por algumas estirpes de micoplasmas, produzindo efeitos deletérios nos cultivos celulares.

Alterações no metabolismo do ácido nucléico podem ocorrer devido à grande quantidade de fosforidase-nucleosídeo do micoplasma. Também possuem grandes quantidades de nucleases capazes de destruir os ácidos nucléicos das células-hóspedes.

Já se observaram rupturas cromosômicas, provavelmente devido a depleção de nutrientes ou a uma destruição de ácidos nucléicos.

2.4.2 Origem e expansão da contaminação

Tecido de origem - Os cultivos primários normais geralmente são livres de contaminação. Os tecidos malignos e necróticos podem ter micoplasmas.

Constituintes do meio de cultivo - podem estar contaminados mas é pouco comum. O soro é o principal contaminante.

Descuidos na assepsia - são a forma mais comum e provável de contaminação por micoplasmas. Os antibióticos no meio de cultivo mascaram as contaminações combinadas bactéria-micoplasma. Se não se fazem provas periódicas, os micoplasmas podem proliferar despercebidos.

Existem vários métodos de detecção, incluindo técnicas de cultivo em meios especiais, ensaios enzimáticos e técnicas microscópicas. Descreveremos a técnica usada no CDC e CEPANZO, para isolamento de PPL0.

Meio de crescimento: PPL0 agar Difco	7 partes
Soro eqüino	2 partes
25% estrato levedura*	1 parte

*ferver em água destilada, clarificar por filtro de papel e ajustar a pH 8 com NaOH, centrifugar por 30 minutos a 1.500 rpm, esterilizar por filtração Seitz, guardar congelado a -20°C.

As amostras, sejam de soro ou sobrenadante de cultivo celular (contato mínimo 3 dias) são semeadas em tubos e em placas. Tubo 0,1 ml da amostra para 9 ml de meio. Placa - 0,1 ml sobre a superfície de 5 ml de agar.

Incubar a 37°C durante 5 dias em aerobiose e anaerobiose.

Repicar 0,1 ml dos tubos para placas e incubar 14 dias a 37°C nas mesmas condições.

Corante de Dienes:	Azul de metileno	2,50 g
	Azur II	1,25 g
	Maltose	10,00 g
	Carbonato de sódio	0,25 g
	Água destilada	100,00 ml

Pingar uma gota de corante em cada placa com colônias.

Cura dos cultivos contaminados

- a) selecionar antibióticos como aureomicina, Kanamicina, cloranfenicol. Geralmente ajudam mas não resolvem o problema;

- b) tratamento dos cultivos por calor a 41°C durante 18 horas;
- c) o uso de anti-soro específico pode ser de grande ajuda.

Precauções

- a) omitir antibióticos nos cultivos-estoque;
- b) controlar os cultivos para micoplasmas, pelo menos uma vez por semana.

2.4.3 Controles

Nos cultivos de monocamada, de 80 a 90% dos micoplasmas estão associados às células. Assim, as células mesmo, devem ser controladas ao serem subcultivadas. O meio sobrenadante pode ser ocasionalmente controlado.

Procedimento

- a) cultivar as células em meio sem antibióticos, pelo menos uma passagem;
- b) após a tripsinização, espalhar cuidadosamente 0,1 ml da suspensão celular e 0,1 ml de uma diluição 1:10 sobre a superfície de placas de agar PPL0 com soro equino, 25% de extrato de levedura e penicilina 50 mg/ml;
- c) incubar as placas a 37°C em estufa de CO₂ mantendo a humidade alta.

Uma contaminação intensa geralmente aparece aos 3-4 dias, porém as placas devem ser observadas durante 14 dias se não aparecem colônias. Existe uma grande variação morfológica, porém usualmente as colônias de micoplasmas têm a forma de ovo frito quando observadas ao microscópio.

As colônias de micoplasmas geralmente têm aspecto granular, exceto na parte central e crescem rapidamente depois do período de latência.

2.5 CULTIVOS DE CÉLULAS EM AGAR

Além das técnicas convencionais de cultivos em monocamada e em suspensão são também utilizadas técnicas de cultivo em agar para estudos especiais. Os virologistas utilizam-nas para ensaios de infecciosidade viral e para isolamento de vírus. Os biólogos utilizam-nas para alguns estudos especiais como: habilidade de formação de colônias de células em vários tipos de medula óssea humana, formação de colônias em vários tipos de tumores sólidos em crianças, estudo de células leucêmicas da medula óssea humana, etc. Os cultivos geralmente são preparados, cobrindo a monocamada de células com uma capa de agar ou pela suspensão de células no agar. A concentração e tipo de agar utilizado depende dos objetivos do experimento. Em determinadas ocasiões não é possível utilizar-se o agar como um meio semi-sólido, nestes casos pode-se utilizar ainda a metilcelulose.

Algumas vezes, as células devem ser coradas com um corante vital (vermelho neutro) que é agregado à capa de agar original ou poderá ser adicionado mais tarde numa segunda capa. As células coradas com vermelho neutro mantêm sua viabilidade por mais tempo se são incubadas no escuro. Quando se utilizar agar ou metilcelulose em baixa concentração, podem ser removidos com facilidade e as células coradas com cristal violeta, fuccina ou Giemsa.

Suspensão BHK 21/13S em agarose

Agarose - Marine Colloids Inc. Rockland, Maine 04841, U.S.A.

Preparar uma solução de agarose a 1% em água bidestilada estéril, dissolver por aquecimento, deixar ferver durante 1 hora para esterilizar. Não deve ser autoclavada pois pode afetar a capacidade de gelatinização.

Para corar se prepara agarose 0,5% com vermelho neutro (solução 1:300), acrescentando-se 3 ml a 100 ml de agarose, concentração final de vermelho neutro 1:10.000.

<u>Agarose:</u>	Earle salina	50 ml
	Eagle AA 100x	5 ml
	Eagle vit 100x	5 ml
	Eagle L-glutamina 100x	5 ml
	Soro de feto bovino	10 ml
	Antibiótico	0,25 ml
	NaHCO ₃ 7,5%	12,5 ml
	Água desmineralizada q.s.p.	250,0 ml
<u>Meio de suspensão celular:</u>	Earle salina	10 ml
	Eagle AA 100x	1 ml
	Eagle vit 100x	1 ml
	Eagle L-glutamina 100x	1 ml
	Soro de feto bovino	2 ml
	Caldo triptose fosfato	10 ml
	NaHCO ₃ 7,5%	2,24 ml
	Nitrato férrico	0,20 ml
	Antibiótico	0,10 ml
Água desmineralizada q.s.p.	100,00 ml	

São utilizadas placas de Petri Falcon de 75 cm² (T.C. flask). A agarose a 1% se mistura em partes iguais ao meio agarose e inocula-se 4,0 ml em cada placa. A mistura agarose e meio deve ser deixada previamente em banho-maria por 1 hora a 42°C (concentração final de agarose 0,5%).

Com o meio de suspensão celular, prepara-se a suspensão de células BHK₂₁/13S em uma concentração de 8×10^7 células/ml.

Esta suspensão celular é misturada em partes iguais com a agarose a 0,5% ficando a agarose 0,25, e as células numa concentração de 4×10^7 células/ml. Esta mistura é mantida em banho-maria a 37°C.

Inocula-se em cada placa Falcon que já contém solidificado os 4,0 ml da mistura de agarose 1% e meio agarose, a.a, 1,0 ml da suspensão celular mais agarose, deixando-se solidificar a temperatura ambiente.

Incubar em estufa de CO₂ a uma temperatura de 33°C por 5 a 7 dias.

Corar com agarose 0,5% com vermelho neutro na concentração final 1:10.000 (banho-maria 42°C). Inocular 2,0 ml em cada placa, deixar 4 horas em contato e realizar a observação.

Referências

1. SEDNICK, W.D. & WIKTOR, T.J. Reproducible plaquing system for rabies, LC and others RNA viruses in BHK 21/13S agarose suspension. *J. Virology* 1 (6): 1224-1226, 1967.
2. VAHERI et alii. *Virology* 27: 239-241, 1965.

2.6 PREPARO E COLORAÇÃO DE CROMOSSOMAS

Para obtermos um número maior de figuras mitóticas, os cultivos utilizados devem estar em período de crescimento logarítmico.

A colchicina bloqueia a maioria das células em mitose na metafase, por uma ação inibidora do fuso celular, e condensa os cromossomas, facilitando a contagem.

A colchicina pode atuar de maneira diferente segundo o tipo de célula.

Para testar a concentração adequada, pode-se começar com 0,5 µg por ml de meio. Geralmente, as células humanas são suscetíveis à colchicina, podendo portanto ser reduzida sua concentração. O tempo de tratamento varia de acordo com cada caso individual, devendo-se em determinados casos diminuir o tempo de exposição.

A colchicina pode ser substituída por seu derivado Colcemid.

A solução hipotônica serve para expandir as células, entrando água no citoplasma, e dispersando desta maneira os cromossomas.

O tratamento dos cultivos, submetidos à ação da colchicina, com tripsina, para dissociar as células, remove proteínas extracelulares e células mortas, tornando a preparação final mais limpa.

A fixação deve ser feita sobre o sedimento celular e não sobre uma suspensão de células, recomendando-se a centrifugação em tubos cônicos. Os passos a seguir, são os seguintes:

- a) selecionar cultivos em fase logarítmica de crescimento, com maior atividade mitótica;
- b) agregar 0,03 ml de Colcemid em solução por cada ml de meio de cultivo. Incubar os cultivos por 1 1/2 a 4 horas a 37°C;
- c) decantar o meio com Colcemid, acrescentar solução de tripsina. Incubar por 15 minutos a 37°C para desprender e dissociar as células da monocamada. Para cultivos em suspensão, este passo é omitido;
- d) colocar a suspensão celular em tubos de centrífuga, preferentemente de 15 ml e cônico. Romper os grumos celulares por pipetagem. Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos. Decantar a solução de tripsina;
- e) agregar aproximadamente 6 ml de solução hipotônica a cada tubo de centrífuga. Ressuspender o sedimento celular com pipeta. Deixar em contato à temperatura de 37°C por 10 minutos;
- f) centrifugar nos tubos originais a 1000 rpm por 5 minutos. Decantar a solução hipotônica e drenar o tubo sobre um papel absorvente;
- g) colocar o fixador aproximadamente 5 a 7 ml, sem perturbar o sedimento celular no fundo do tubo. Fixar, pelo menos, 20 minutos à temperatura ambiente;
- h) remover o fixador completamente. Colocar 4 ou 5 gotas de acetorceína no tubo. A quantidade do corante depende do volume do "pellet" celular. Suspender o sedimento com uma pipeta-Pasteur;
- i) são feitas preparações achatadas (squash) imediatamente após a preparação da suspensão celular. Colocar uma pequena gota

de célula corada sobre uma lâmina limpa. Cobrir com uma lamínula (22 x 30 mm), absorver o excesso de corante com papel-filtro. Pressionar com os polegares o papel-filtro colocado sobre a lamínula, que não deve ser deslocada, para não estragar a preparação. Quando por ação da pressão a lamínula se desloca, jogar fora a preparação e providenciar outra;

- j) observar ao microscópio de contraste de fase para ver se as células foram bem preparadas e conservam sua estrutura. Repetir a pressão sobre a lamínula se necessário;
- k) selar os lados das lamínulas com cera Krönig;
- l) contagem em microscópio de controle de fase objetiva 100 x e ocular 25 x, e
- m) desenhar em câmara clara.

Reactivos

Solução de Colcemid:

Colcemid - Ciba Pharmaceutical Inc. London, England.

Preparar uma solução-estoque de 2 µm por ml de solução salina balanceada.

Filtrar, esterilizar e manter em refrigeração.

Usar 0,03 ml para cada ml de meio de cultivo.

Solução de Colchicina:

Colchicina - Eimer and Amend Co. St. Louis. U.S.A.

Preparar uma solução de 1:10.000 em água destilada ou em salina balanceada.

Esterilizar e manter em refrigeração.

Usar 0,2 ml para cada 10 ml de meio de cultivo.

1 g em 10.000 ml; 1 mg em 10 ml; 1.000γ em 10 ml; 100γ em 1 ml.

Em 0,2 ml há 20γ

Solução de Tripsina:

Tripsina 1:300, N.B.C. ou Difco 1:250.

Preparar uma solução de 0,25% em Hank's sem Mg e Ca.

Manter em refrigerador.

Solução Hipotônica:

Preparar uma solução a 1% de citrato de sódio em água destilada.

Pode-se usar também uma solução salina a 0,17%.

Não é necessário manter em refrigerador.

Fixador:

Ácido acético glacial a 50% em água destilada.

Corante:

Preparar 2 g de orceina sintética em 50% de ácido acético glacial (2%).

Ferver durante 30 minutos, filtrar quando estiver frio.

A solução deve ser refiltrada ao usar, para eliminar precipitado.

Cera Seladora:

Cera "Deckglaskitt nach Krönig", comprada em George T. Gurr, London, England.

Referências

1. LEVAN, A. Cancer 9: 648-663, 1956.
2. FORD, C.E. & HAMERTRON, J.L. Stain Technol. 31: 247-251, 1956.
3. HSU, T.C. & KLATT, O. J. National Cancer Inst. 21 (3): 437-473, 1958.
4. TJIO, J.E. & PUCK, T.T. J. Exp. Medicine 108 (2): 259-268, 1958.
5. HSU, T.C. & KELLOGG, D.S. J. National Cancer Inst. 25 (2): 221-235, 1960.
6. HSU, T.C. J. Hered. 43: 167, 1952.

2.7 CONGELAMENTO DE CULTIVOS CELULARES

A Criogenia é a ciência e tecnologia da produção e utilização de temperaturas ultra baixas.

A Criobiologia é a ciência das células vivas em relação ao ultra-frio. Nosso interesse em criobiologia é essencialmente prático, já que desejamos manter numerosas linhas e estirpes celulares para estudos virológicos e por intermédio de técnicas criobiológicas economizar espaço, pessoal técnico e equipamentos, evitando, por outro lado, contaminações e alterações morfológicas e de suscetibilidade dos cultivos celulares, conseguindo-se em qualquer momento reviver segundo as necessidades, as células em congelação.

Nas aplicações práticas desta técnica estão incluídas a inseminação artificial, conservação de sangue, congelamento de células, a criocirurgia e o banco de órgãos humanos (conservação de córnea, medula óssea, etc.).

O gás criogênico mais usado é o nitrogênio que alcança uma temperatura de -196°C . O hélio líquido chega a -269°C , aproximando-se do zero absoluto, -273°C . O estímulo mais significativo dado à criobiologia foi a demonstração de Polge, Smith e Parkes em 1949 de que a adição de glicerina ao meio de suspensão, permite a sobrevivência dos espermatozóides do homem, dos coelhos e das aves, após uma congelação a -79°C .

Em 1950 demonstrou-se que com 15 a 30% de glicerina os glóbulos vermelhos se congelam a -79°C , sem que seja produzida hemólise.

Por experiências zoológicas, tinha-se conhecimento que os insetos aumentam o nível de glicerina durante o período de hibernação.

Em amostras de cristais de sal, coletadas em Irkutsk, foram encontradas bactérias fossilizadas a 100 milhões de anos, conservadas em gelo.

Experiências russas com larvas de borboletas congeladas lentamente em hélio líquido (-269°C) demonstraram que de 20 larvas congeladas 13 sobreviveram e desenvolveram-se normalmente, após serem descongeladas.

O frio diminui o metabolismo celular, mas por si só não causa a morte. A morte das células dos mamíferos é provocada por uma combinação de fatores. Danos mecânicos por formações de cristais de gelo e danos químicos pelo aumento da concentração de sais e diminuição do pH, desidratação e outros fatores que não são ainda totalmente conhecidos, tais como um metabolismo não balanceado, devido a algumas enzimas que continuam funcionando.

A glicerina baixa o ponto de congelação, facilita o movimento de extração da água das células e aumenta a quantidade de água ligada à célula, mecanismo que limita o grau de concentração eletrolítica e a desidratação. Um mol de glicerina produz a congelação de aproximadamente 3 moles de água. Uma molécula de glicerina pode ligar 3 moléculas de água. Mann em 1964 observou que a glicerina estabiliza o conteúdo protéico e enzimático, evitando a desnaturalização das proteínas que em muitos casos é provocada pela ação dos eletrólitos em alta concentração.

A congelação deve ser lenta para permitir a difusão da glicerina através da membrana celular, mantendo o equilíbrio osmótico. Conseqüentemente, o resfriamento lento na proporção de 1°C por minuto, foi considerado o melhor para a congelação de células com glicerina. A velocidade de difusão da glicerina varia muito para as células de diferentes espécies e a velocidade de congelação deve ser ajustada para cada caso em particular.

A penetração da glicerina através da membrana dos eritrocitos humanos é 50 vezes mais rápida do que nos de cães e 170 vezes mais rápida no homem do que nas ovelhas.

Baixa difusão da glicerina - gato, suínos e bovinos.

Rápida difusão da glicerina - rato, camundongos, coelho e cobaias.

O êxito de uma boa congelação depende da concentração satisfatória de glicerina no interior das células.

O gelo seco (CO_2 sólido) e o álcool propiciam uma mistura congeladora de -79°C sendo a mais barata e simples para produzir baixas temperaturas.

Pode-se reproduzir alterações nas células congeladas por temperaturas inadequadas de armazenamento. Recomenda-se nitrogênio líquido (-196°C) para longos períodos de armazenamento em recipientes especiais, eliminando-se assim falhas elétricas ou mecânicas dos congeladores. Um rápido descongelamento, $3^{\circ}\text{C}/\text{segundo}$, diminui o tempo de exposição à alta concentração do soluto, durante o período crítico entre -50°C e 0°C .

Tem sido usado na congelação de células dimetil sulfoxide (DMSO) em substituição à glicerina por possuir uma difusão mais rápida, através da membrana celular e quando é usado na mesma concentração que a glicerina, dá resultados superiores na congelação de diversos cultivos celulares, especialmente células de tipo fibroblástico e linfócitos.

A efetividade de qualquer procedimento de congelação é medida pela demonstração de que os subcultivos de células congeladas possuem propriedades idênticas aos cultivos pais antes da congelação. Características diferenciais como morfologia celular, média de crescimento, complemento cromossômico, marcadores bioquímicos, antigenicidade, tumorigenicidade e suscetibilidade a vírus dão os meios para estabelecer identidade entre cultivos pré e pós-congelação. Até o momento, não foram encontradas modificações ou alterações destas características pela congelação, seja em células diplóides ou em células com cariotipos anormais.

A preservação de células por congelação nos dá um meio para manter grandes quantidades de stock de células padronizadas e bem caracterizadas para distribuição e uso.

2.7.1 Técnica geral de preservação de células por congelamento

Descreve-se a técnica utilizada em células BHK₂₁ C13 de MacPherson e Stoker:

- selecionar cultivos semi-confluentes com bom aspecto morfológico;
- tripsinizar. Em casos especiais centrifugar a 800 rpm por 10 minutos;
- suspender em meio de conservação: solução Eagle 60 partes; soro

bovino, 20 partes; caldo triptose fosfatado, 10 partes e glicerina ou DMSO, 10 partes, a razão de 1 ml por 2×10^6 células. Pode ser usado até 5×10^6 células por ml;

- encher as ampolas com 1 a 5 ml da suspensão celular, colocá-las em uma caixa de poliestireno com álcool;

- colocar a caixa em um congelador Revco a -79°C pelo menos 16 horas. Após este tempo, as ampolas podem ser colocadas em nitrogênio líquido.

2.7.2 Recuperação das células

- descongelar rapidamente em banho-maria a 37°C , deixando-se por 15 minutos;

- ressuspender cada ampola em 10 ml de meio de crescimento. Recontar para determinar a perda de células;

- semear em garrafas de Milk Dilution. Mudar o meio no dia seguinte.

2.8 FORMULAÇÃO DE VACINA COM ADJUVANTE OLEOSO

2.8.1 Mistura trivalente de antígeno

Os antígenos monovalentes inativados são recebidos da área de vírus e são estocados em tanques móveis de aço inoxidável ou em recipientes plásticos em câmara fria a 4°C .

Cada antígeno é mantido separado até que seja liberado por uma prova de inocuidade em culturas celulares em garrafas rolantes com células de monocamada ou de suspensão, comprovando-se a ausência de vírus ativo.

Durante a mistura dos antígenos monovalentes para a formulação de uma partida de vacina trivalente se adiciona mertiolato numa concentração de 1:30.000 e tiosulfato de sódio para neutralizar o inativante, preparado em concentração molar, adicionando 2,5 ml por litro de antígeno.

A mistura dos antígenos monovalentes é controlada pela sorologia determinando tipo e título fixador 50%.

2.8.2 Mistura e filtração do adjuvante oleoso

Marcol 52	9 partes
Montanide 80 ou 888	1 parte

A mistura se realiza num tanque e se agita bem pelo menos durante 30 minutos.

A filtração se realiza por meio de filtros de placa Millipore. Faz-se uma clarificação por AP25 e AP15, montados num filtro 293 mm e uma filtração esterilizante por membrana GS (0,22 µm), montada em outro filtro. Recomenda-se que a filtração se faça com o adjuvante aquecido a 50°C.

Também se recomenda filtrar a mistura por cartucho, sendo um CP15 como clarificante e um Durapore CVGL01TP1 (0,22 µm) como elemento esterilizante. Esta filtração se realiza a temperatura ambiente.

2.8.3 Operação dos emulsificadores de vacina

Ha dois emulsificadores instalados em linha entre dois tanques com conexão a um tanque de envase.

Esterilização

Dar entrada de vapor a 1 Bar (14,6 lb/polegada²) durante 30 minutos, mais 30 minutos de vapor fluente.

1. Fechar todos os registros dos emulsificadores para não danificar, com o excesso de pressão, os selos John Crane. Deverão ser abertos após a estabilização da pressão recomendada.

2. Dar entrada de vapor a todos os tanques com uma única saída pelo fundo do tanque de envase, que é o ponto de saída da conexão para a máquina de envase.

3. Quando tiver saído toda a água condensada extrair o ar dos tanques pelos filtros Domnick Hunter (DH) e estabilizar o vapor na pressão

recomendada, regulando a válvula redutora da pressão do vapor, as saídas dos filtros DH e as mangueiras que necessitam ser esterilizadas.

4. Quando se conseguir estabilizar a pressão a 1 Bar, abrir os registros dos emulsificadores (4 registros), extrair a água condensada e marcar os 30 minutos de esterilização.

5. Passados os 30 minutos marcados, abrir mais os registros dos filtros DH e as saídas das mangueiras que deverão ser esterilizadas por vapor fluente durante mais 30 minutos. Colocar papel-alumínio nas saídas das mangueiras, soltas para protegê-las após correr o vapor.

6. Fechar as entradas de vapor aos tanques e as saídas das mangueiras. Abrir as entradas de ar comprimido previamente regulado a um máximo de 10 lbs/polegada² pelos filtros DH com saída ao final da linha para eliminar toda a água de condensação.

7. Fechar a entrada do ar comprimido, deixado abertos os filtros DH para manter a pressão atmosférica no interior dos tanques.

Emulsificação

É o conjunto de operações que determinam a formação de uma emulsão primária do tipo água em óleo como deve ser a vacina recomendada pelo CPFA.

1. Carregar o tanque com 100 litros da mistura óleo-emulsificante (9 partes de óleo mineral branco (Marcol 52) mais 1 parte de emulsificante (Montanide 80 ou 888) previamente misturados e esterilizados por filtração.

2. Adicionar 100 litros de antígeno trivalente OAC sobre o óleo mantendo-se agitação eficiente (velocidade 8) com um fluxo de \pm 10 litros por minuto. Para estabilizar o fluxo de entrada do antígeno, regular a pressão do ar comprimido a 0,5 Bar e controlar o registro de entrada ao tanque. Manter a agitação por 5 minutos depois da entrada dos 100 litros de antígeno.

3. Passar através do emulsificador a mistura óleo-antígeno para uniformizar o tamanho das gotas do antígeno na emulsão. São feitas duas passadas, que são necessárias para eliminar a condutividade elétrica da suspensão, medida entre 10 a 25 Megahom.

2.8.4 Controles do produto terminado

2.8.4.1 - Esterilidade

A vacina é semeada nos seguintes meios bacteriológicos: caldo simples, tioglicolato e Sabouraud. Cada tubo recebe 0,5 ml da vacina, semeando 8 tubos com cada amostra proveniente de 3 a 4 frascos de vacina.

A metade dos tubos é incubado a 37°C e a outra metade é incubada a temperatura ambiente por um período de pelo menos 15 dias.

A vacina é considerada estéril quando não há desenvolvimento de microorganismos viáveis em nenhum dos tubos semeados.

2.8.4.2 - Inocuidade

A emulsão é quebrada com clorofórmio, em partes iguais, agitando fortemente por 10 a 15 minutos e deixando a 4°C por 24 horas. Em seguida, se centrifuga a 2.500 rpm por 20 minutos e o sobrenadante é inoculado em garrafas rolantes com células BHK de suspensão ou de monocapa. Realizam-se três passagens sucessivas com intervalos de 48 horas. A última passagem é controlada por sorologia. A vacina é considerada livre de vírus ativo quando não há efeito citopatogênico em nenhuma das passagens.

2.8.4.3 - Imunogenicidade - doses protetoras cobaio 50%

Com diluições da vacina, geralmente de 1/4, 1/16 e 1/64 são vacinados cobaios com um peso superior a 500 gramas. Como diluente usamos uma mistura em partes iguais de Marcol 52 - Montanide 888 e PBS, emulsificada num aparelho Silverson de bancada.

Os cobaios são confrontados 30 dias mais tarde com uma suspensão de vírus que contenha 10^4 DG50 cobaio/ml, por inoculação intradermo-plantar em uma pata. A leitura final é realizada no 5º dia.

Tanto as vacinas terminadas como os antígenos monovalentes emulsificados como mini-vacinas são submetidos a esta prova.

Consideramos 10,00 DPC₅₀ o mínimo para formular uma vacina com o antígeno monovalente provado.

2.9 GLOSSÁRIO DE TERMOS MAIS USADOS

Alteração celular: uma mudança brusca na característica de uma linha, usualmente associada ao aparecimento de uma linha celular estabelecida e com alterações na morfologia, cariotipo, suscetibilidade viral e a capacidade de crescimento em suspensão.

Cariotipo: o número de cromossomas de uma célula única e que pode identificar os cromossomas de um indivíduo e de uma espécie.

Centrômero: área não corada de um cromossoma, que separa os braços entre si. O ponto de inserção do cromossoma ao fuso mitótico.

Estirpe celular: pode ser derivada de um cultivo primário ou de uma linha celular por seleção ou clonagem de células que possuem propriedades específicas ou marcadoras. Estas marcas podem persistir durante todos os cultivos seguintes. Geralmente diploides e de crescimento limitado no tipo.

Ciclo celular: o ciclo vital de uma célula que inclui mitose (M) e interfase. A célula progride de M a G1, a S, a G2 e novamente a M.

Clone: denota uma população de células derivadas de uma célula única por mitose.

Cromatina: áreas de um núcleo de uma célula que se coram de maneira especial com um corante de ADN.

Cromatina sexual: área característica da heterocromatina no núcleo, composta de material de cromossoma X, que se cora intensamente com um corante de ADN.

Cromatídio: uma das duas subunidades longitudinais, destacadas por luz microscópica, de um cromossoma metafásico.

Cultivo celular: o crescimento, desenvolvimento ou proliferação de células *in vitro*.

Cultivo de órgão: a manutenção ou o crescimento de tecidos, de parte ou de um órgão completo *in vitro*, de tal maneira que permita a diferenciação e preservação da arquitetura e/ou função.

Cultivo primário: cultivo iniciado de células, tecidos ou órgãos procedentes diretamente de organismo animal ou vegetal.

Efeito citopático: alteração morfológica das células produzidas (citopatogenicidade) por agentes infecciosos ou tóxicos.

Explante: fragmento de um tecido ou de um órgão, utilizado para iniciar um cultivo *in vitro*.

Fitohemaglutinina: um mitógeno vegetal.
(PHA)

Índice mitótico: número de mitoses por um número total de células, em uma determinada amostra, expressada em percentagem.

Inibição de contato: a inibição da expansão e da proliferação de uma célula ao estabelecer contato com outra célula. Princípio que determina a formação da monocamada.

- Linha celular: provém de um cultivo primário após ser subcultivado e clonado. O termo implica na presença de várias estirpes de células originalmente presentes no explante primário.
- Linha celular diploide: é a linha celular que tem, pelo menos, 75% de suas células com o mesmo cariótipo das células normais da espécie da qual foi originalmente obtida.
- Linha celular heteroploide: é a linha celular que contém menos de 75% de suas células com cromossomos diploides.
- Linha celular estabelecida: uma linha celular que possui potencialidade de ser cultivada indefinidamente *in vitro*.
- Mitôgeno: substância capaz de induzir mitose (mitogênica).
- Monocamada: camada de células que crescem sobre uma superfície plana como uma única camada.
- Placa: área localizada de destruição celular em um cultivo em monocamada.
- Subcultivo: cultivo iniciado de um cultivo primário por tripsinização.
- Unidades formadoras de placas (UFP): uma unidade de medida do conteúdo de vírus. A menor quantidade de vírus capaz de produzir uma placa em um cultivo celular.

Editado e impresso no
CENTRO PAN-AMERICANO DE FEBRE AFTOSA (OPAS/OMS)
Caixa Postal 589, 20001 Rio de Janeiro, RJ, Brasil