



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus "Luiz de Queiroz"
Centro de Energia Nuclear na Agricultura



MANUAL DE BIOSSEGURANÇA

2025

Manual de Biossegurança

Manual elaborado com base no documento “Manual de Biossegurança da Comissão de Biossegurança do Instituto de Química da USP”.

Elaborado por:

Prof. Dr. Ricardo Giordano

Prof. Dr. Fábio Forti

Profa. Dra. Regina Baldini

Prof. Dr. Carlos Hotta

Profa. Dra. Flavia Vischi Winck

Revisado e modificado por Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do CENA-USP

Profa. Dra. Flavia Vischi Winck - Coordenadora

e-mail: winck@cena.usp.br

Telefone: (019) 34294848

Secretária

Suzineide de Fatima Manesco de Almeida

Telefone: (019) 34294683

E-mail CIBio: cibio@cena.usp.br

SUMÁRIO

Sobre o Manual	02
1. INFORMAÇÕES IMPORTANTES.....	05
2. TELEFONES ÚTEIS.....	05
3. GLOSSÁRIO	05
4. INTRODUÇÃO A SEGURANÇA BIOLÓGICA (BIOSSEGURANÇA).....	06
4.1. Classificação dos Micro-Organismos Infectantes	07
5. NORMAS DE CONDUTA GERAIS	09
5.1. Normas de Segurança em laboratórios de Biossegurança do CENA-USP	09
5.1.1. Aspectos gerais	09
5.1.2. Treinamento em biossegurança	10
6. NORMAS DE CONDUTAS ESPECÍFICAS	10
6.1. Procedimentos de Higienização de Superfícies e Equipamentos.....	17
6.2. Procedimentos usuais de desinfecção	19
6.3. Condutas em caso de derramamentos e acidentes laboratoriais com organismos geneticamente modificados (OGMs) ou material potencialmente infectante.....	20
6.4. Acidentes com OGM.....	21
6.4.1. Vias de Infecções	21
6.5. Procedimento pós exposição a materiais biológicos.....	22
6.6. Laboratórios de biossegurança do CENA-USP	23
6.6.1. Laboratórios nível I (NB1)	23

6.6.2. Laboratórios nível II (NB2)	27
7. PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DO CENA (POPS CENA)	30
7.1 Descarte de resíduos biológicos	30
7.2. Procedimento para descontaminação de áreas com derrame de organismos geneticamente modificados (OGMs).....	30
7.3. Autoclaves	31
7.3.1. Procedimento operacional para autoclaves verticais	32
7.4. Centrífugas	34
7.4.1. Procedimento operacional para microcentrífugas.....	35
7.4.2. Procedimento operacional para centrífugas de chão.....	36
7.5. Agitadores de chão (shakers).....	37
7.6. Incubadoras de CO2.....	39
7.7. Cabines de biossegurança (Fluxos Laminares)	40
7.8. Demais Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) do CENA	42
7.8.1. Índice dos POPs	42
7.8.1.1. Microrganismos e OGM congelados em nitrogênio líquido	43
7.8.1.2. Orientações gerais para derramamento em Centrífugas	44
7.8.1.3. Operação da Autoclave	44
7.8.1.4. Orientações gerais para derrames de OGM	45
7.8.1.5. Procedimento de uso de cabine de segurança biológica (Fuxo Laminar).....	45
7.8.1.6. Procedimento de descarte de perfuro cortantes.....	46
7.8.1.7. Procedimento de descontaminação de superfície de trabalho	46
7.8.1.8. Procedimento de desinfecção de aventais em laboratórios NB-1 e NB-2.....	47
7.8.1.9 Procedimento em laboratórios NB-2 do CENA USP	47
7.8.1.10. Procedimentos de emergência e descarte de OGMs.....	48
7.8.1.11. Transporte de OGM NB-1 dentro do CENA-USP.....	49
7.8.1.12. Transporte de OGM NB-2 dentro do CENA-USP.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INFORMAÇÕES IMPORTANTES:

Em caso de acidentes envolvendo organismos geneticamente modificados (OGM), informe imediatamente o ocorrido para o pesquisador responsável pelo laboratório. Comunique, também, o ocorrido a CIBio do CENA-USP. Os telefones de contato devem estar anotados claramente nas placas de sinalização do seu laboratório.

2. TELEFONES ÚTEIS:

Serviço de Ambulância	192
Corpo de Bombeiros	193
Polícia Militar	190

3. GLOSSÁRIO

OGMs – Organismos geneticamente modificados

OMS – Organização mundial de saúde

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CENA – Instituto de Química

USP – Universidade de São Paulo

NB – Nível de Biossegurança

PVPI – Polivinilpirrolidona

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

4. INTRODUÇÃO A SEGURANÇA BIOLÓGICA (BIOSSEGURANÇA)

As infecções associadas ao trabalho com micro-organismos em laboratórios têm ocorrido desde os primórdios da Microbiologia. Muitas vezes tais infecções podem resultar na morte do indivíduo, animais, plantas e o meio ambiente em geral. Ao contrário dos acidentes envolvendo substâncias químicas e fogo, onde a causa e o efeito são prontamente identificados, é mais difícil, na maioria das vezes, determinar-se que certa moléstia infecciosa foi contraída no laboratório. O indivíduo pode ficar enfermo por muitos dias ou semanas após o contágio, sem fazer associação. É particularmente difícil fazer tal tipo de associação com doenças que são frequentes na comunidade, tais como tuberculose, hepatite e febre tifoide. Por isso, é essencial a atenção aos cuidados com a sua segurança ao trabalhar num laboratório biológico.

A experiência tem demonstrado que a inocuidade do trabalho de pesquisa com micro-organismos perigosos depende das boas práticas de laboratório, da disponibilidade e uso de equipamentos de segurança da instalação, do funcionamento do local das pesquisas e de uma organização eficiente. Os “riscos biológicos” pode ser classificados de acordo com sua gravidade inerentes às pesquisas com micro-organismos patogênicos e vários acidentes ocorridos em laboratórios suscitam, atualmente, preocupação, levando assim, ao fortalecimento de medidas de segurança ao manipular microrganismos nos laboratórios. Em outros casos, os microrganismos podem ser patógenos de plantas importantes para a agricultura do País, como por exemplo, o cancro cítrico, bactéria que infecta laranjeiras e pode destruir uma safra. Sua liberação para o meio ambiente pode ser danosa para a produção agrícola. Outro cuidado importante é referente ao transporte de amostras entre laboratórios, isto porque, nestes casos, pode-se contaminar as dependências externas ao seu laboratório e, no processo, liberando os organismos no meio ambiente. Por isso, é importante conhecer os riscos envolvidos com a sua pesquisa, saber como manipular o organismo geneticamente modificado (OGM) ou não, de forma segura para você, seus colegas e o meio ambiente.

O programa especial da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre medidas de segurança em Microbiologia estabeleceu, com o apoio financeiro de grande número de países, uma classificação dos micro-organismos segundo os riscos que apresentem, normas internacionais sobre segurança nos laboratórios, medidas de urgência nos casos de acidentes nos laboratórios ou durante o transporte de amostras. Materiais que podem causar infecções ou que são tóxicos são sempre potencialmente perigosos. Tais materiais devem ser tratados com o devido respeito e com muito cuidado. Quando empregados de maneira incorreta no laboratório podem ser muito perigosos, não somente para o indivíduo que está trabalhando, mas para os outros que estão próximos ou mesmo para a comunidade, pois muitas vezes mecanismos de disseminação, como correntes de ar, podem espalhar e distribuir os agentes patogênicos ou toxinas a grandes distâncias. Desde que, para evitar contaminação, existe a necessidade de aplicação das boas práticas de laboratório, o microbiologista deve estar seguro de que seus técnicos cultivam e empregam estas práticas.



Pictograma para matérias infectantes

Desta forma, todos os laboratórios que trabalham com microrganismos devem ser devidamente sinalizados, como veremos mais adiante.

4.1. Classificação dos Micro-Organismos Infectantes

Para que se tomem as providências adequadas, num caso de emergência, é necessário que se tenha conhecimento do grau do perigo apresentado pelo micro-organismo em

questão. Existem várias classificações de micro-organismos, mas nenhuma delas dá ênfase suficiente na transmissão dos agentes microbianos; assim, para direcionar as emergências foi elaborada uma classificação dos micro-organismos infectantes, de acordo com o grupo de risco.

- **Grupo de Risco I – Pouco risco individual e comunitário.** Neste grupo estão incluídos os micro-organismos que têm baixas probabilidades de provocar moléstias humanas e são de pouca importância veterinária.
- **Grupo II – Risco individual moderado, risco comunitário limitado.** Estão aqui agrupados os agentes patogênicos que podem provocar moléstias humanas e aos animais, mas que têm baixas probabilidades de causar perigo grave para o pessoal do laboratório e a comunidade, animais de criação ou para o meio ambiente. A exposição no laboratório pode provocar infecção grave, mas, são disponíveis medidas eficazes de tratamento e prevenção, limitando assim, o risco de propagação.
- **Grupo III – Risco individual elevado, pequeno risco comunitário.** Os agentes patogênicos deste grupo provocam moléstias humanas graves, mas que não se propagam de uma pessoa infectada para outra.
- **Grupo IV – Elevado risco individual e comunitário.** Os agentes patogênicos deste grupo provocam graves moléstias humanas e nos animais, podendo propagar-se facilmente de um indivíduo para outro direta ou indiretamente.

Para saber a qual grupo pertence um organismo específico a ser manipulado em seu laboratório, consulte a normativa da ANVISA "Classificação de Risco dos Agentes Biológicos" com a lista completa dos microrganismos (disponível na página da CIBio do CENA USP - <http://www.cena.usp.br/pesquisa/comissoes-pesquisa>).

5. NORMAS DE CONDUTA GERAIS

Para trabalhar num laboratório de biossegurança é obrigatório o uso de equipamentos de proteção (EPIs). Procedimento geral: ao entrar no laboratório, lave as mãos, vista seu avental, e utilize todos os EPIs necessários para seu trabalho (luvas, óculos de proteção e/ou máscara).

- Luvas.
- Aventais/jalecos
- Máscaras
- Óculos
- Sapatos fechados
- Calças

5.1. Normas de Segurança em laboratórios de Biossegurança do CENA-USP

5.1.1. Aspectos gerais

As normas de segurança nos laboratórios de biossegurança do CENA-USP tem o objetivo de proteger a saúde dos profissionais do laboratório no nosso Instituto e do público geral que circula pela nossa instituição, bem como proteger o meio ambiente dos riscos associados à exposição accidental a micro-organismos, organismos e materiais biológicos experimentais.

Os acidentes em laboratórios de Microbiologia, normalmente ocorrem pela formação de aerossóis, por respingos, pipetagens incorretas, injeções, trabalhos com grandes quantidades e/ou concentrações elevadas de micro-organismos, laboratórios superlotados de pessoal e material, infestação por roedores, por insetos e entrada de pessoas não autorizadas. Para evitar a maior parte destes riscos, devem ser tomados cuidados especiais, desde a concepção geral e instalação do laboratório.

As infecções por micro-organismos em laboratórios de Microbiologia podem ocorrer através da pele, das vias digestivas e mucosa bucal, das vias respiratórias e mucosa nasal e dos olhos e ouvidos.

As regras a seguir constituem a base das práticas seguras de laboratório. Em muitos laboratórios estas normas podem ser estabelecidas como regulamento de trabalho. Serão apresentadas aqui as regras mais importantes, às quais, podem ser acrescentadas outras, muitas delas, específicas para cada laboratório onde se trabalha particularmente com determinado agente patológico.

5.1.2. Treinamento em biossegurança

Todo o pessoal autorizado para trabalhar nos laboratório de biossegurança do CENA USP deve passar por treinamento específico. Cursos de biossegurança, organizados pela CIBio, serão ministrados periodicamente para os funcionários do CENA. Alunos de pós-graduação devem se inscrever e serem aprovados no início do semestre letivo na disciplina obrigatório de Segurança de Laboratório. Os alunos de iniciação científica, pós-doutores e pesquisadores visitantes devem assistir as aulas online de biossegurança (ENDEREÇO) e assinarem o termo de compromisso com a CIBio.

6. NORMAS DE CONDUTAS ESPECÍFICAS

- Conheça o Mapa de Riscos de seu local de trabalho, ou seja, onde estão os organismos biológicos, onde são manipulados, estocados, descartados, etc;
- Ao entrar no laboratório, lave as mãos, vista seu avental, e utilize todos os EPIs necessários para seu trabalho (luvas, óculos de proteção e/ou máscara);



- Não se alimente, não beba e não guarde alimentos no local de trabalho;
- Não fume no laboratório;
- Não aplique cosméticos no recinto de trabalho;
- NUNCA pipete com a boca material infeccioso ou tóxico; proteja a ponta superior das pipetas com algodão antes da esterilização e utilize ponteiras com filtro, para minimizar as chances de contaminar o aparelho pipetador;
- Mantenha o laboratório limpo e em ordem, devendo ser dele retirados quaisquer materiais que não tenham relação com o trabalho;

- NUNCA descarte material biológico no lixo comum do laboratório; use apenas lixeiras com **SACOS BRANCOS** próprios para o lixo biológico (Figura abaixo);



- Lembre-se, vidro frio e vidro quente são iguais. Uma solução infectada com microrganismo, muitas vezes é igual a uma solução não infectada.
- Desta forma, uma pipeta com água, solução tampão ou meio de cultura virgem, é igual a uma pipeta com meio infectado.
- Materiais e soluções contidas em laboratórios de biossegurança devem ser sempre tratados como potenciais carregadores de material infectante. A presença ou ausência de um agente infectante em um material ou solução pode ser indistinguível a olho nu.
- SEMPRE descarte material utilizado para experimentos com material biológico no lixo biológico do seu laboratório, mesmo que a pipeta tenha sido utilizada apenas para pipetar solução salina;
- As superfícies de trabalho devem ser descontaminadas, pelo menos, uma vez por dia e sempre que ocorrer caso de derramamento de substâncias potencialmente perigosas. Utilize com etanol 70% ou solução de hipoclorito para isto;
- O pessoal de laboratório deve lavar as mãos depois de haver manipulado materiais e animais infectados, e também ao deixar o laboratório;
- Deve ser desenvolvido o hábito de conservar as mãos longe da boca, nariz, olhos e rosto;

-
- Deve ser evitado o uso de barba e os cabelos compridos devem estar sempre presos;
 - Todos os procedimentos devem ser efetuados de maneira a se evitar, ao máximo, a formação de aerossóis;
 - As superfícies das bancadas devem ser recobertas com papel absorvente, sempre que exista a possibilidade de respingamento de material perigoso;
 - As sub-culturas de micro-organismos infecciosos devem ser feitas em cabines de biossegurança (fluxo laminar);
 - Todos os líquidos e sólidos contaminados devem ser descontaminados antes de eliminados ou então, reutilizados. Os materiais esterilizados em autoclaves ou incinerados fora do laboratório deverão ser acondicionados em recipientes fechados e impermeáveis;
 - Use sempre avental ou uniforme enquanto estiver no laboratório; estas roupas não devem sair do recinto de trabalho sem o procedimento adequado. Devem ser esterelizados na autoclave (ver o procedimento operacional na página da CIBio para "*Procedimento para esterilização e lavagem de aventais usados em laboratórios NB-1 e NB-2*") antes de lavado;
 - SEMPRE use sapatos fechados quando estiver trabalhando no laboratório;
 - É PROIBIDO o uso de sandálias abertas ou de dedos nos laboratórios de biossegurança;
 - Sempre que for necessário proteja os olhos e o rosto, de respingos ou impactos usando óculos de segurança, escudos faciais, máscaras ou qualquer outro dispositivo de segurança;
 - As bancadas do laboratório devem ter a superfície muito lisa, de maneira a serem facilmente limpas e desinfectadas;
 - Um aviso na porta do laboratório deverá ser colocado indicando a natureza do agente patogênico com que se trabalha;
 - Somente deverão ser autorizadas a entrar no laboratório pessoas que tenham sido informadas sobre os possíveis riscos e satisfaçam os requisitos que se exigem para o acesso; durante o trabalho, as portas devem ser mantidas fechadas; somente terão acesso ao local animais e pessoas autorizadas; não se deve permitir a entrada de

crianças no laboratório;

- Não se deve permitir a entrada no laboratório de animais que não tenham relação com os trabalhos que estão sendo efetuados;
- Deve ser estabelecido um programa de luta contra os insetos e roedores;
- As pipetas usadas devem ser imediatamente imersas em desinfetantes;
- Em caso de respingos, cubra imediatamente a área com desinfetante adequado.
- Quando trabalhar com toxinas ou outras substâncias tóxicas de origem biológica, se informe na literatura sobre como manusear e descartar o produto. Por exemplo, a toxina botulínica deve ser coberta com solução saturada de carbonato de sódio antes de ser descartada;
- Nunca umedeça rótulos com a língua; use água ou rótulos auto-adesivos;
- Use seringas e agulhas hipodérmicas somente para injeção parental, aspiração de líquidos dos animais de laboratório e de vacinas contidas em frascos com tampas perfuráveis. Não as use para manipular líquidos infecciosos; nestes casos, devem ser empregadas pipetas automáticas;
- Não empregue chumaços de algodão ao esvaziar uma seringa contendo ar ou excesso de líquido. Use um pequeno frasco cheio de algodão embebido em desinfetante;
- Antes e depois de injetar materiais infecciosos em animais, esfregue o local da injeção com desinfetante;
- Utilize seringas com acessório especial para evitar que a agulha se separe da seringa;
- NUNCA recoloque a proteção de uma agulha. NUNCA reutilize uma agulha. Após o uso, descarte a agulha na caixa coletora de materiais perfurocortantes (Figura abaixo).



- Em todos os trabalhos nos quais existe possibilidade de contato direto acidental com sangue, material infeccioso ou animais infectados, devem ser usadas luvas; estas luvas, antes de descartadas, devem ser esterilizadas em autoclaves;
- Nunca manuseie sangue infectado com micro-organismos ou de pacientes sem a devida supervisão ou treinamento;
- TODO o material de origem humana deve ser obtido de empresas que tiveram protocolo aprovado por comissão de ética em estudos com humanos, ou de colaboradores que tiveram seu protocolo aprovados por estas comissões.
- O CENA não tem uma comissão de ética em estudos com humanos, por isso, não temos autorização para fazer este tipo de coleta ou trabalhar com este tipo de material sem aprovação prévia;
- Todos os derramamentos, acidentes e exposições reais ou potenciais por material infectado devem ser imediatamente notificados ao chefe do laboratório. Devem existir protocolos escritos para estes episódios, onde são previstos avaliações, vigilância e tratamento médico apropriados;

-
- Exames de sangue realizados previamente, ou amostras de soro sanguíneo de todo o pessoal do laboratório e demais pessoas expostas aos riscos a ele inerentes, devem ser conservadas como referência;
 - As centrífugas usadas para material tóxico ou infeccioso devem ser protegidas por anteparos;
 - Use para centrifugação somente tubos não danificados e tampados. Tenha certeza de que o líquido contido no tubo não transbordará durante a centrifugação;
 - Culturas líquidas de organismos altamente infecciosos requerem cuidados especiais, pois qualquer movimento que agite a superfície do líquido produzirá aerossol; os ICENAUidificadores dão origem a pesados aerossóis;
 - Os meios de cultura sólidos e/ou líquidos utilizados para crescimento de bactérias devem ser autoclavados antes de serem encaminhados ao lixo comum;
 - Siga as instruções do CENA USP e do laboratório para descartar substâncias químicas, agentes biológicos, radioativos, resíduos e rejeitos; informe-se dos procedimentos junto às Comissões pertinentes;
 - O chefe do laboratório deve providenciar para que o pessoal receba uma formação apropriada sobre segurança no laboratório. Deve ser adotado o manual de biossegurança, assim como os procedimentos operacionais do CENA-USP, além de protocolos específicos da pesquisa do laboratório em questão. O manual de biossegurança e os procedimentos operacionais deverão ficar em lugar visível e de fácil acesso. Todas as instruções devem ser lidas e observadas rigorosamente.

6.1. Procedimentos de Higienização de Superfícies e Equipamentos

O quê?	Quando	Com o quê?	Como
<u>Aparelhos</u>	semanalmente após exposição a OGMs	pano seco ou húmido água e sabão álcool 70%	remover sujeira limpeza desinfecção
<u>Autoclave</u>	semanalmente	água e sabão; trocar a água	remover sujeiras prevenir contaminações
<u>Banho-maria</u>	semanalmente	água e sabão; álcool 70%	retirar a água, realizar a limpeza e esterilização com etanol
<u>Centrífugas</u>	semanalmente e após utilização	água e etanol 70%	retirar o rotor, desinfetar com etanol 70% e lavar com água corrente
<u>Estufa</u>	mensalmente ou após contaminação	água e sabão; etanol 70%	remover as prateleiras e realizar o procedimento recomendado pelo fabricante
<u>Cabine de biossegurança (fluxo laminar)</u>	diariamente (antes e após o uso)	água e sabão; etanol 70%	limpar a superfície com água e sabão; desinfecção com etanol 70%

<u>Filtro do ar condicionado</u>	mensal e semestral	água e sabão; solução de hipoclorito	deixar de molho em solução por 30 minutos, enxaguar, fazer leve compressão para remover excesso de água. Recolocar o filtro.
<u>Freezers e geladeiras</u>	mensalmente	água e sabão	transferir o conteúdo para outro freezer; degelar; limpeza.
<u>Bancadas</u>	diariamente ou após contaminação com OGMs	pano ou papel descartável; álcool a 70%.	remover a contaminação; Passar sobre a superfície e deixar solução em contato por 15 minutos, depois secar com papel absorvente seco
<u>Paredes</u>	trimestral	água e sabão;	limpeza
<u>Pias</u>	diariamente	água e sabão;	limpeza
<u>Pisos</u>	Diariamente ou após contaminação com material biológico	pano ou papel absorvente; água e sabão; hipoclorito 2%	remover a contaminação; limpeza; passar pano embebido na solução e aguardar 30 minutos para secagem com pano seco
<u>Lixeiras</u>	semanalmente	água e sabão; solução de hipoclorito 5%	limpeza; deixar de molho em solução por 30 minutos, enxaguar, secar com material absorvente.

6.2. Procedimentos usuais de desinfecção:

Álcool a 70% (etanol ou isopropílico):

O álcool a 70% (v/v) é um dos desinfetantes mais empregados no laboratório.

Utilização: para desinfecção da pele, bancada e equipamentos.

Procedimento: Após a limpeza com água e sabão deve-se esfregar um pano ou algodão embebido com a solução de álcool a 70%.

Tempo de inativação: deixar a superfície a ser descontaminada em contato com a solução por no mínimo 15 minutos.

Preparo do Álcool a 70% (v/v):

Etanol a 95° (p/v)..... 73,7ml

Água destilada q.s.p..... 100 ml

Hipoclorito de sódio 2%:

Utilização: descontaminação de pisos, vidrarias, inativação química de material biológico.

Procedimento: Após a limpeza com água e sabão deve-se passar pano ou material absorvente com a solução de hipoclorito 2% no piso, ou submergir vidraria em solução, garantindo que a solução esteja em contato com toda parede do objeto a ser descontaminado.

Atenção, para descontaminação de resíduos líquidos e semi-sólidos, colocar hipoclorito concentrado na proporção de 1 para 19 partes do resíduo em descontaminação (concentração final 0,1% de hipoclorito).

Tempo de inativação: deixar em contato a superfície a ser descontaminada por no mínimo 20 minutos.

IMPORTANTE: Os frascos de hipoclorito devem ser claramente identificados como etCENAuetas contendo a data de preparo e o prazo máximo para uso, considerando-se que o mesmo é facilmente degradável. Devem ser armazenados, de preferência, em frascos escuros para minimizar fotodegradação.

6.3. Conduas em caso de derramamentos e acidentes laboratoriais com organismos geneticamente modificados (OGMs) ou material potencialmente infectante

- Em caso de derramamento de material biológico, o local precisa ser imediatamente identificado com alerta de RISCO e isolado;



- Cobrir a área de derramamento completamente com material absorvente e aplicar solução de hipoclorito concentrado (2%). Após 30 (trinta) minutos, deve ser iniciado o procedimento de limpeza.
- Utilize material absorvente descartável (toalhas de papel, compressas de gaze, panos de limpeza) para absorver o derramamento. Se o volume derramado for grande, pode ser usado material absorvente granulado para absorver o líquido;
- Use luvas (resistentes), avental e proteção facial, proteger os calçados com material impermeável e descartável;
- Se o derramamento contiver vidro quebrado ou outros objetos, esses devem ser descartados sem contato manual direto. Podem ser usadas folhas rígidas de cartão ou pás de lixo plásticas, dotadas de dispositivo para impulsionar os detritos em um recipiente para os recolher; ou usar pinças. Estas deverão ser descartadas



juntamente com os objetos num recipiente apropriado para material com risco biológico e à prova de perfurações;

- Se houver a possibilidade de formação de gotas, ex: quebra dentro da centrífuga, o equipamento deve permanecer fechado durante pelo menos meio hora a fim de permitir que as gotas assentem, antes de se iniciar a descontaminação;
- Absorver a maior parte do líquido antes da limpeza;
- Enxágue o local do derramamento com água a fim de remover produtos químicos nocivos ou odores.
- Seque o local do derramamento para prevenir escorregões.
- Todo material descartável utilizado na descontaminação precisa ser esterilizado antes de ser descartado.

6.4. Acidentes com OGM

6.4.1. Vias de Infecções:

Via aérea: Inalação de aerossóis com soluções ou partículas infectantes que podem se formar durante a remoção de tampas de tubos de ensaio ou frascos, em pipetagem rápida, por centrifugação de tubos destampados e/ou por aquecimento rápido.

Oral: Geralmente ocorre por pipetagem com a boca ou o ato de levar a mão ou objetos contaminados à boca. É **PROIBIDO** pipetar com a boca nos laboratórios do CENA-USP.

Inoculação direta: Picadas acidentais de agulhas, lancetas, cacos de vidro, arranhões ou cortes podem ser facilmente contaminados por contato com amostras biológicas infectantes. Apenas usuários avançados e treinados pelo professor responsável pelo laboratório podem manipular organismos OGMs ou não nível II com seringas e agulhas.

Mucosas: Contato direto ou indireto de agente infectante com as mucosas da boca e olhos.

6.5. Procedimento pós exposição a materiais biológicos

Comunicar imediatamente o docente responsável pelo laboratório e um representante da Comissão Interna de Biossegurança. Seguir as recomendações do procedimento operacional descrito para o organismo OGM manipulado no seu laboratório. Abaixo, os procedimentos gerais:

- Aplicar solução anti-séptica sobre a região exposta ao agente potencialmente infectante percutânea ou cutânea (PVPI, álcool iodado ou álcool 70%) e na mucosa oral (clorexidina a 4%), deixando em contato por um tempo mínimo de 15 minutos;
- Nas exposições de mucosas e olhos, deve-se lavar exaustivamente com água ou solução fisiológica; familiarize-se com a posição do lava-olhos mais próximo do seu laboratório;
- Atenção: a utilização de soluções irritantes como éter, hipoclorito de sódio ou glutaraldeído são contra-indicados.

Cabe ao responsável e/ou à Comissão de Biossegurança avaliar e classificar a cada caso de acidente ocorrido em particular o grau de risco e medidas a serem tomadas, com base em informações técnicas científicas e relato dos envolvidos. Para a tomada de decisões, é preciso reunir a maior quantidade de informações possíveis, como:

- Definição do tipo de material biológico envolvido (risco biológico);
- Gravidade e tipo da exposição;
- Identificação ou não do paciente-fonte e de sua condição sorológica anti-HIV, hepatites, dentre outros;

Todo e qualquer agente desinfetante e anti-séptico comercial utilizado precisa ser registrado na ANVISA e conferido quanto à data de validade.

6.6. Laboratórios de biossegurança do CENA-USP

6.6.1. Laboratórios nível I (NB1)

Os laboratórios NB1 são utilizados para manipular organismos (OGMs ou não) da classe de risco 1 (baixo risco individual e para a comunidade). São todos os organismos que não estão listados como classes 2, 3 ou 4, e inclui os agentes biológicos conhecidos por não causarem doenças no homem ou nos animais adultos saudáveis. Exemplos: *Escherichia coli* K12, *Lactobacillus* sp. e *Bacillus subtilis*. Para saber a qual classe pertence o organismo que você irá manipular, consulte a normativa da ANVISA "Classificação de Risco dos Agentes Biológicos" com a lista completa dos microrganismos.

Os laboratórios Nível de Biossegurança 1 (NB-1) devem ser adequados às atividades e projetos que envolvam OGM da classe de risco 1, realizadas nas seguintes condições:

- a) não é necessário que as instalações estejam isoladas das demais dependências físicas da instituição, sendo as atividades e projetos conduzidos geralmente em bancada, biotério ou casa de vegetação;
- b) a equipe técnica e de apoio deverá ter treinamento específico nos procedimentos realizados nas instalações e deverá ser supervisionada pelo técnico principal (professor responsável);
- c) as instalações NB-1 devem ser desenhadas de modo a permitir fácil limpeza e descontaminação;
- d) a superfície das bancadas deve ser impermeável à água e resistente a ácidos, álcalis, solventes orgânicos e a calor moderado;
- e) os espaços entre as bancadas, cabines e equipamentos devem ser suficientes de modo a permitir fácil limpeza;

- f) OGMs serão manipulados em áreas sinalizadas com o símbolo universal de risco biológico, com acesso restrito à equipe técnica e de apoio ou de pessoas autorizadas;

Nome do Laboratório	
(NB-1)	RISCO BIOLÓGICO 1
Docentes responsáveis: Profa. Dra. XXXXXXXX (11) 3091-0000; (011) Telefone Pessoal para contato	Nível de segurança biológica: NB1 OGM: P.ex., <i>Escherichia coli</i>
Técnicos responsáveis: Nome Telefone para contato (11) XXXX-XXXX	CQB-0029/97
Entrada Reservada Somente a pessoal autorizado	

- g) as superfícies de trabalho devem ser descontaminadas pelo menos uma vez ao dia ou sempre que ocorrer contaminação. Recomenda-se que seja desinfetada no início e ao final da jornada de trabalho;
- h) todo resíduo líquido ou sólido contaminado deve ser descontaminado antes de ser descartado, assim como todo material ou equipamento que tiver entrado em contato com o OGM;
- i) deve-se utilizar dispositivo mecânico para pipetagem;
- j) alimentos devem ser guardados em áreas específicas para este fim, fora

das instalações, sendo proibido comer, beber, fumar e aplicar cosméticos nas áreas de trabalho;

- k) antes de deixar as instalações, as mãos devem ser lavadas sempre que tiver havido manipulação de organismos contendo DNA/RNA recombinante;
- l) pias para lavagem das mãos e equipamentos de proteção individual e coletiva devem ser utilizados para minimizar o risco de exposição ao OGM;
- m) é proibida a admissão de animais que não estejam relacionados ao trabalho em execução nas instalações;
- n) extrema precaução deve ser tomada quando forem manuseadas agulhas, seringas e vidros quebrados, de modo a evitar a auto-inoculação e a produção de aerossóis durante o uso e o descarte. As agulhas não devem ser entortadas, quebradas, recapeadas ou removidas da seringa após o uso. Agulhas, seringas e vidros quebrados devem ser imediatamente colocados em recipiente resistente a perfurações e autoclavados antes do descarte;
- o) materiais contaminados só podem ser retirados das instalações em recipientes rígidos e à prova de vazamentos;
- p) deve ser providenciado um programa rotineiro adequado de controle de insetos e roedores. Todas as áreas que permitam ventilação deverão conter barreiras físicas para impedir a passagem de insetos e outros animais;
- q) Manual de Biossegurança – CENA-USP deve estar disponível em local acessível no interior dos laboratórios de biossegurança.

- r) devem ser mantidos registros de cada atividade ou projeto desenvolvidos com OGM e seus derivados;
- s) atividades e projetos com organismos não geneticamente modificados que ocorram concomitantemente e nas mesmas instalações com manipulação de OGM devem respeitar a classificação de risco do OGM;
- t) todo material proveniente de OGM e seus derivados deverá ser descartado de forma a impossibilitar seu uso como alimento por animais ou pelo homem, salvo o caso em que este seja o propósito do experimento, ou se especificamente autorizado pela CIBio ou CTNBio;

A porta de entrada do laboratório deve estar devidamente sinalizada (sinalizações disponíveis junto a CIBio):



6.6.2. Laboratórios nível II (NB2)

Os laboratórios NB2 são para manipulação de organismos (OGMs ou não) que apresentam moderado risco individual e limitado risco para a comunidade. Inclui os agentes biológicos que provocam infecções no homem ou nos animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente é limitado, e para os quais existem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Exemplos: *Schistosoma mansoni* e Vírus da Rubéola. Para saber a qual classe pertence o organismo que você irá manipular, consulte a normativa da ANVISA "Classificação de Risco dos Agentes Biológicos" com a lista completa dos microrganismos.

Os laboratórios de Nível de Biossegurança 2 (NB-2) devem ser adequados às atividades e projetos que envolvam OGM de classe de risco 2, realizadas nas seguintes condições:

- a) as instalações e procedimentos exigidos para o NB-2 devem atender às especificações estabelecidas para o NB-1 acrescidas da necessidade de haver uma autoclave disponível em seu interior, de modo a permitir a descontaminação de todo o material antes do descarte, sem o trânsito do OGM por corredores e outros espaços não controlados;
- b) deve-se sempre utilizar cabines de segurança biológica (Classe I ou II);
- c) cabe ao Técnico Principal (professor responsável) a responsabilidade de avaliar cada situação e autorizar quem poderá entrar ou trabalhar nas instalações NB-2;
- d) deve ser colocado um aviso sinalizando o nível de risco, identificando o OGM e o nome do Técnico Principal (professor responsável), endereço completo e diferentes possibilidades de sua localização ou de outra

pessoa responsável e o contato com a CIBio;

- e) o Técnico Principal (professor responsável) deve estabelecer políticas e procedimentos, provendo ampla informação a todos que trabalhem nas instalações sobre o potencial de risco relacionado às atividades e projetos ali conduzidos, bem como sobre os requisitos específicos para entrada em locais onde haja a presença de animais para inoculação;
- f) no interior das instalações, os frequentadores devem utilizar os equipamentos apropriados de proteção individual tais como jalecos, luvas, toucas, máscaras, óculos, protetores pró-pé, entre outros, os quais devem ser retirados antes da pessoa deixar as instalações credenciadas;
- g) após o uso, os equipamentos de proteção individual não descartáveis devem ser limpos e guardados fora da área contaminada e as pessoas devem ser treinadas para seu manuseio e guarda apropriada;
- h) todos os requisitos necessários para a entrada nas instalações credenciadas devem estar indicados na porta de entrada;
- i) as superfícies de trabalho das cabines de segurança e de outros equipamentos de contenção devem ser descontaminadas sempre ao término das atividades com OGM;
- j) para experimento de menor risco realizado concomitantemente no mesmo local, deverá ser adotado o nível NB-2;
- k) quando apropriado, a equipe técnica e de apoio deve estar vacinada contra os agentes infecciosos relacionados aos experimentos conduzidos nas instalações NB-2;

- l) exames médicos periódicos para os trabalhadores das instalações onde são conduzidos atividades e projetos com OGM podem ser solicitados pela CTNBio, incluindo avaliação clínica laboratorial de acordo com o OGM envolvido, levando-se em consideração as medidas de proteção e prevenção cabíveis.

Sinalização para laboratórios NB-2 (disponíveis junto a CIBio):



7. PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DO CENA (POPS CENA USP)

7.1. Descarte de resíduos biológicos

São considerados neste caso, resíduos biológicos, aqueles oriundos de culturas celulares, estacionárias ou em suspensão (tais como células de mamíferos, células de insetos, protozoários, vírus, bactérias, leveduras, plantas).

O descarte de resíduo biológico é feito diretamente nas pias, após descontaminação com hipoclorito de sódio 2% (diluição de 1/10-1/20). Após adicionar o hipoclorito, aguardar 20 minutos para efetuar o descarte. Enxaguar o frasco e deixar na pia ou bacia para ser coletado e lavado. O descarte de placas de ágar contendo microrganismos pode ser feita em lixo de saco branco após descontaminação com hipoclorito 2% por 20 minutos, ou após esterilização por autoclavagem.

Em caso de microrganismos patogênicos, recomenda-se autoclavar os meios antes do descarte. Em caso de dúvidas, não faça o descarte e consulte o técnico do grupo ou o responsável pelo laboratório para obter as informações corretas.

7.2. Procedimento para descontaminação de áreas com derrame de organismos geneticamente modificados (OGMs)

Orientações Gerais para Derrames Simples:

- Impedir a Propagação do OGM fechando as portas do laboratório
- Neutralizar a solução derramada com hipoclorito 2%. Deixe agir por 20 minutos
- Conter o derrame com papel absorventes, descartando todo o material contaminado em sacos brancos para lixo infectante
- Descontaminar a área e os equipamentos afetados

7.3. Autoclaves

A autoclave é um dos aparelhos mais utilizados para descontaminação de materiais de laboratório e hospitais. O processo de autoclavagem consiste em expor o material contaminado a vapor de água em altas temperaturas. Para que o processo seja eficiente, é preciso que a temperatura seja acima do ponto de ebulição da água (100°C, pressão nível do mar). Por isso, as autoclaves trabalham sob pressão (1 kgf/cm² ou 1 atm), o que permite atingir a temperatura de 121°C. Para que o processo seja eficiente, os microrganismos e OGMs devem ser autoclavados por no mínimo 20 minutos ou, mais recomendável, por pelo menos 30 minutos.

Existem diversos modelos de autoclaves, por isso, consulte o manual de operações do aparelho que se encontra no seu laboratório, antes de operar a autoclave. É obrigatório receber treinamento de pessoal treinado no seu laboratório antes de utilizar a autoclave. Nunca deixe uma autoclave ligada sem atenção. É obrigatório que alguém responsável esteja no laboratório enquanto a autoclave estiver ligada e em uso.

O tipo mais comum de autoclave no CENA USP é a vertical, ilustrada na figura abaixo:



7.3.1. Procedimento operacional para autoclaves verticais:

- Abrir a autoclave e verificar o nível da água
- Colocar o material na cesta, obedecendo a capacidade do aparelho



- Fechar a autoclave, apertando bem os manípulos de fechamento



- Feche o registro e ligue a autoclave no máximo
- Quando atingir 1 atm ou 121°C, diminua o aquecimento para o mínimo e comece a contar o tempo de autoclavagem.



- Após 30 minutos, desligue a autoclave e aguarde a pressão abaixar para 0 atm. Agora é seguro abrir a autoclave.
- LEMBRE-SE, enquanto a autoclave estiver ligada, não deixe o aparelho sem atenção constante.

É importante que a autoclave esteja certificada para uso. Recomenda-se ainda, que sejam realizados semanalmente testes de eficiência utilizando-se, por exemplo, bioindicadores para monitoramento de ciclos de esterilização a vapor (disponíveis no mercado).

Caso a autoclave não esteja funcionando (ou o ciclo de esterilização não esteja efetivo), o material biológico deve ser transportado em sacos brancos vedados para a autoclave mais próxima antes de ser descartado.

7.4. Centrífugas

As centrífugas são equipamentos muito utilizados na manipulação de microrganismos e OGMs. A centrifugação é o processo de separação em que uma amostra fluída é submetida a uma força centrífuga que permite a separação por sedimentação ou pela diferença de densidades entre seus componentes. São, portanto, uma fonte importante de contaminação e devem ser manipuladas com atenção. De forma geral, estes equipamentos contém com um rotor onde são colocados os tubos contendo OGMs ou microrganismos. Este rotor atinge altas velocidades, permitindo que o OGM seja coletado no fundo do tubo.

Muita atenção deve ser dada a possíveis vazamentos de líquidos e OGMs durante o processo de centrifugação. Por isso, após o uso, o rotor e a câmara da centrífuga devem ser desinfetados com etanol 70% ou hipoclorito (NaClO 2%). Lave e seque bem o rotor, antes de recolocá-lo na centrífuga para que o seu colega possa utilizar o aparelho.

As centrífugas mais comuns em laboratórios biológicos são as microcentrífugas e as centrífugas de chão. Consulte os manuais de operações das centrífugas que se encontram no seu laboratório antes de utilizá-las. Ao primeiro uso, procure por alguém treinado que possa supervisioná-lo.

7.4.1. Procedimento operacional para microcentrifugas:

- Ligue a centrífuga e abra a tampa.



- Observe se a centrífuga e o rotor estão limpos. Se estiver com líquido ou material suspeito, consulte os colegas para saber quem foi a última pessoa a utilizar o aparelho. Peça para que ele seja limpo e desinfetado.
- Coloque os tubos que serão centrifugados.
- Lembre-se, os tubos colocados em posição diametralmente oposta devem conter o mesmo volume. Mesmo que você centrifugue apenas um tubo, é necessária a colocação de um segundo tubo (balanço), na caçapa oposta, para que o rotor esteja equilibrado.



- Coloque a cobertura do rotor e feche a tampa da centrífuga.
- Ajuste a velocidade e tempo de centrifugação desejados.
- Acione a centrífuga, e aguardar SEMPRE a centrífuga chegar à velocidade selecionada.
- Ao termo do processo, remova os tubos, observe se houve vazamento.
- Nunca deixe a centrífuga operando sem alguém por perto.
- Limpe e centrífuga com etanol 70%, seque o rotor e desligue a centrífuga.

7.4.2. Procedimento operacional para centrífugas de chão:

IMPORTANTE: Os procedimentos específicos para operação da centrífuga de seu laboratório ou grupo podem ser diferentes dos procedimentos listados abaixo, que são gerais. Converse com o responsável do seu laboratório e receba treinamento adequando antes de operar a centrífuga

Observações importantes:

- Observar as condições da centrífuga antes do uso (limpeza, erros, problemas mecânicos, etc.).
- Colocar o rotor desejado. Rotores podem ser pesados e se caírem podem provocar graves acidentes. Caso necessário solicite a ajuda de outra pessoa.
- Selecionar as garrafas a serem utilizadas respeitando o modelo correto para cada rotor; sempre observar a quantidade que cada garrafa pode acomodar e se elas estão em bom estado (ausência de rachaduras e sujeira, presença das borrachas de vedação, etc.).
- As garrafas devem sempre ser utilizadas aos pares e com o mesmo peso (variação máxima de 0,1g).
- Acomodar as garrafas no rotor e prender corretamente a tampa, em alguns casos o rotor precisa ser fixado ao eixo.
- Verificar novamente se o rotor está corretamente balanceado e fechado.
- Selecionar no painel da centrífuga o código do rotor, a velocidade de rotação e a temperatura.
- Iniciar a centrifugação, aguardar **SEMPRE** a centrífuga chegar à velocidade selecionada.
- Após a centrifugação, observe se ocorreu vazamento das amostras; neste caso, providencie a limpeza imediata da centrífuga (meios de cultura contém sais que oxidam a câmara e as partes internas da centrífuga, o que pode quebrá-la ou gerar acidentes).
- Se houver reserva do equipamento na sequência, manter a centrífuga ligada com a tampa fechada; se não houver reserva, desligá-la e manter a tampa aberta.

7.5. Agitadores de chão (shakers)

Nunca opere um *shaker* sem possuir treinamento adequado para o determinado modelo. Shakers são equipamentos delicados, seu uso incorreto pode acarretar em baixa vida útil, o que gera custos e atrapalha o andamento dos experimentos de todos.

Observações importantes:

- Observar as condições do shaker antes do uso (limpeza, erros, problemas mecânicos, etc.), se possuir algum problema contatar o responsável pelo equipamento;
- Colocar os frascos desejados; existem diversos tamanhos de garras que devem ser utilizadas exclusivamente para o seu fim (erlenmeyers, placas ou tubos de ensaio);



Figura - Frascos para cultura de OGM acomodados com presilhas próprias para o tamanho do frasco.

- Utilizar exclusivamente Erlenmeyers, Placas e tubos de ensaio (ou falcon) apropriados para cultura de células e OGMs;
- Tubos de ensaio devem ser colocados exclusivamente em suportes específicos.
- Placas de PCR ou similares possuem garras próprias;
- As garras devem ser distribuídas uniformemente para não forçar o motor da plataforma;
- Não utilizar fita de qualquer tipo para prender recipientes;
- NUNCA utilize o shaker com um frasco que não esteja preso corretamente à plataforma;



Figura - Frasco cultivado de forma inadequada, sem suporte suficientes. Se a cultura tombar, irá vazar o OGM para o meio ambiente.

- Selecionar no painel do shaker a velocidade de rotação e a temperatura;
- Iniciar a rotação, aguardar SEMPRE o shaker chegar à velocidade selecionada;
- Após a utilização sempre observe se ocorreu vazamento das amostras; neste caso, providencie a limpeza imediata do *shaker*, inclusive embaixo da plataforma (meios de cultura contém sais que oxidam a câmara e as partes internas da shaker, o que pode quebrá-lo ou gerar acidentes);
- Desligar após o uso.
- Qualquer material indevidamente colocado ou não identificado será imediatamente descartado.

7.6. Incubadoras de CO₂

Nunca opere uma estufa sem possuir treinamento adequado para o modelo em uso no seu laboratório. Estufas são sensíveis as variações de temperatura e muito suscetíveis a contaminações, devemos utilizá-las com cuidado para garantir o sucesso dos experimentos de todos.

Observações importantes:

- Nunca altere nenhuma programação da estufa, comunique qualquer irregularidade ao responsável pela sala de cultura de células;
- Todo frasco com cultura celular para ser guardado na incubadora deve estar identificado com o nome do usuário, data e tipo de material cultivado;
- Minimizar o abrir e fechar da porta da incubadora, algumas linhagens celulares são sensíveis a flutuação de CO₂;
- Evite mudar de lugar os frascos que já estão dentro da incubadora;
- Qualquer dúvida, procurar o responsável pela sala de cultura de células.

OBS: Os cilindros de gás (CO₂) devem ser acomodados e seguros em edículas apropriadas e o gás transportado para a sala de cultura por linhas de gases apropriadas.

7.7. Cabines de biossegurança (Fluxos Laminares)

Nunca trabalhe numa cabine de biossegurança sem possuir treinamento adequado para o determinado modelo. Fluxos laminares são equipamentos de uso geral e de ambiente limpo. Em caso de utilização incorreta ou sujeira acumulada, pode ocorrer contaminação do experimento. Em caso de dúvidas, procure orientação dos responsáveis pelo equipamento.

Observações importantes:

- Não utilizar materiais inflamáveis e/ou solventes orgânicos. A cabine pode pegar fogo.
- Observar as condições do fluxo antes do uso (limpeza, problemas mecânicos, lâmpadas queimadas, etc.);
- Ligar o fluxo laminar;
- Efetuar a limpeza da parte interna do fluxo com álcool 70%;
- Se desejar, acionar a lâmpada UV e aguardar, no máximo, 15 minutos (Nunca se exponha a luz ultravioleta, ela pode causar sérios danos à pele);

-
- Não deixar pipetadores ou outros materiais plásticos sob a ação da luz UV, com o tempo o plástico começa a degradar, estragando o material; nestes itens passe apenas um papel embebido com álcool 70% para desinfecção;
 - Levar somente o material necessário ao fluxo, muito material atrapalha a circulação de ar e diminui sua eficiência;
 - Cada fluxo possui cartuchos de pipetas de vidro de todos os volumes, após utilizar sempre feche os cartuchos;
 - Se acabarem as pipetas de vidro de algum cartucho temos cartuchos sobressalentes no armário ao lado dos fluxos, sempre levar os cartuchos vazios para a sala de lavagem;
 - Se necessário, ligar o bico de Bunsen abrindo as duas válvulas de gás. Utilizá-lo com muito cuidado, sem encostar em materiais plásticos (pipetas, placas, etc.); NUNCA ligue um bico de bunsen com etanol dentro do fluxo.
 - Sempre desligar o bico assim que terminar o trabalho ou quando se afastar do equipamento;
 - Se derramar qualquer líquido remova os painéis inferiores e efetue a limpeza completa do fluxo;
 - No caso de derramamento de OGMs, desinfetar a cabine com solução de hipoclorito 2% ou etanol 70%.
 - Após o uso colocar o fluxo em modo standby;

7.8. Demais Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) do CENA-USP

Os usuários do CENA-USP devem se familiarizar com todos os procedimentos operacionais do CENA-USP, que encontram-se no site (www2.CENA.usp.br/cibio). Estes POPs devem ser impressos e mantidos, atualizados, em uma pasta de fácil acesso a todos os usuários do laboratório.

7.8.1. **Índice dos POPs**

- Microrganismos e OGM congelados em nitrogênio líquido
- Orientações gerais para derramamento em Centrifugas
- Operação da Autoclave
- Orientações gerais para derrames de OGM
- Procedimento de uso de cabine de segurança biológica (Fuxo Laminar)
- Procedimento de descarte de perfuro cortantes
- Procedimento de descontaminação de superfície de trabalho
- Procedimento de desinfecção de aventais em laboratórios NB-1 e NB-2
- Procedimento em laboratórios NB-2 do CENA USP
- Procedimentos de emergência e descarte de OGMs
- Transporte de OGM NB-1 dentro do CENA-USP
- Transporte de OGM NB-2 dentro do CENA-USP

7.8.1.1. Microrganismos e OGM congelados em N2 ICENAuido

Operação para o descongelamento e o transporte de microrganismos e OGMs congelados:

CAUTION: Nitrogênio líquido é extremamente frio (-196 °C) e pode causar congelamento da pele. Manipule com cuidado e use os EPIs apropriados (luvas térmicas, sapato fechado, jaleco reforçado).

MATERIAS NECESSÁRIOS: a) EPIs para manipular N2 líquido e b) caixa de isopor com tampa contendo gelo seco.

1. Usar EPIs para o transporte (avental, luvas e máscara). Não é permitido o transporte de OGM sem EPIs dentro do CENA-USP.
2. É obrigatório o uso de máscara de proteção no caso respingos de N2 líquido ou do frasco explodir.
3. Retirar a ampola ou tubo do botijão de nitrogênio líquido e colocá-lo imediatamente na caixa com gelo seco.
4. Transportar a ampola ou tubo criogênico para a sala de cultura.
5. Proceder com o descongelamento, colocando a ampola ou tubo criogênico no banho a 37 °C. Fechar imediatamente o banho com a tampa. Usar a máscara de proteção, pois o tubo ainda pode explodir!
6. Uma vez que as células descongelaram e tubo atingiu 37 °C, você já pode retirar a máscara, levar o tubo para o fluxo laminar, e continuar o procedimento de cultura celular.
7. Em caso de acidente (explosão do tubo) dentro da caixa de gelo seco, iniciar o procedimento de desinfecção. Deixe a caixa com o gelo-seco fechada, em lugar isolado e identificada com o símbolo de material biológico. Quando o gelo-seco evaporar completamente, jogue hipoclorito 2% para desinfetar, deixe agir por 30 minutos, e descarte a caixa no lixo biológico.
8. Em caso de acidente no banho-maria, jogue solução de hipoclorito 2% na água e deixe agir por 30 minutos. Limpe a tampa com hipoclorito também. Descarte a água do banho.

7.8.1.2. Orientações gerais para derramamento em centrifugas

1. Desligar a centrífuga e manter fechada por 30 minutos para dispersão de aerossóis.
2. Usar EPIs (luvas e avental).
3. Retirar estilhaços com auxílio de pinça, e descartar em caixa de perfuro-cortante
4. Limpar caçapas, pinos e rotor com solução de hipoclorito de sódio a 2%
5. Limpar internamente a centrífuga com gaze embebida em uma solução de hipoclorito de sódio 2%.
6. Repetir o processo com um pano embebido em água e sabão
7. Descartar todo o material no lixo infectante
8. COMUNICAR o responsável do laboratório sobre o acidente

=====

7.8.1.3. Operação da Autoclave

Operação:

1. Abrir a tampa e colocar água na caldeira, até cobrir o descanso do cesto. Em seguida, introduzir o material a ser esterilizado, fechar a tampa, apertando por igual os manípulos;
2. Abrir o registro de vapor e ligar a chave no calor máximo (MÁX);
3. Saindo vapor pela válvula, esperar 10 minutos para que todo o ar seja expulso do interior da autoclave e, só então, fechar a válvula;
4. Quando a pressão (1,1 Kgf) e temperatura (121° C) de trabalho forem atingidas, mudar a chave para a posição MÉDIO, a fim de manter a pressão;
5. Terminado o tempo de esterilização (20 minutos), desligar a autoclave; **NÃO ABRA A AUTOCLAVE AINDA!**
6. Esperar que o ponteiro do manômetro desça até o zero e, então, abrir a válvula de vapor;
7. Aguardar 5 minutos e abrir a tampa.

Limpeza:

A água na caldeira deve ser trocada conforme necessidade.

7.8.1.4. Orientações gerais para derrames de OGM

- Impedir a Propagação do OGM fechando as portas do laboratório
- Neutralizar a solução derramada com hipoclorito 2%. Deixe agir por 20 minutos
- Sinalizar a área contendo o derramamento
- Conter o derrame com papel absorventes, descartando todo o material contaminado em sacos brancos para lixo infectante
- Descontaminar a área e os equipamentos afetados

=====

7.8.1.5. Procedimento de uso de cabine de segurança biológica (Fluxo Laminar)

Antes de iniciar o trabalho:

1. Limpar toda a superfície interna da cabine com álcool 70%;
2. Verificar se existem pipetas, ponteiras (preferencialmente com filtros) e tubos suficientes para o experimento;
3. Colocar o pipetador dentro da capela biológica;
4. Ligar a ventilação da cabine e a luz UV por 10 a 15 minutos antes do uso.

Durante o uso:

1. Conduzir as manipulações no centro da cabine, mantendo o vidro frontal na posição;
2. Minimizar os movimentos dentro da cabine.

Após o termino do trabalho:

1. Limpar e guardar o pipetador automático desligado e carregando;
2. Limpar a superfície de trabalho da cabine com álcool 70%;
3. Deixar a cabine e a luz UV ligadas por 10 a 15 minutos;
4. Desligar o fluxo laminar completamente.

As cabines devem ser certificadas anualmente. Filtros e lâmpadas devem ser trocados quando necessário.

7.8.1.6. Procedimento de descarte de Perfurocortantes

Os materiais perfurocortantes (como agulhas e seringas, bisturis e lâminas cortantes) devem ser descartados separadamente, no local de sua geração, imediatamente após o uso ou necessidade de descarte.

É expressamente proibido o esvaziamento dos recipientes para perfurocortantes para o seu reaproveitamento.

As agulhas descartáveis devem ser desprezadas juntamente com as seringas, quando descartáveis, sendo proibido reencapá-las ou proceder a sua retirada manualmente.

Os recipientes coletores só devem ser preenchidos até os 2/3 de sua capacidade, ou o nível de preenchimento ficar a 5 (cinco) cm de distância da boca do recipiente

=====

7.8.1.7. Procedimento de descontaminação de superfície de trabalho

Antes de iniciar o trabalho:

- 1 – Desinfetar a bancada com álcool 70%

Após o termino do trabalho:

- 1 – Guardar todo material utilizado
- 2 – Limpar e desinfetar a bancada com álcool 70%
- 3 – Descartar resíduos em local adequado
- 4 – Deixar a bancada organizada

7.8.1.8. Procedimento de desinfecção de aventais em laboratórios NB-1 e NB-2

1. Os aventais utilizados em laboratórios de biossegurança devem ser lavados semanalmente.
2. Colocar os aventais NB-1 ou NB-2 em um saco de lixo biológico limpo. Não misturar os aventais NB-1 com os aventais NB-2. Eles devem ser esterilizados separadamente.
3. Colocar o saco na autoclave e proceder com a esterilização dos mesmos seguindo os procedimentos operacionais de autoclavagem.
4. Após o término do ciclo, retirar os aventais da autoclave e lavá-los normalmente com água e sabão.
5. Os aventais esterilizados podem ser levados para casa pelo funcionário/aluno para lavagem.
6. É obrigatório que os laboratórios tenham dois pares de aventais NB-1, e quando necessário, NB-2, também) para cada membro do grupo. Desta forma, quando um deles estiver sendo em uso, o outro poderá ser lavado.

=====

7.8.1.9. Como trabalhar em um laboratório NB2

Apenas pessoas autorizadas podem entrada nos laboratórios NB-2 (se o seu nome não estiver na lista afixada na porta de entrada, **NÃO ENTRE!**)

É obrigatório o uso de mascaras, luvas e aventais dentro do NB2.

1. Avental: Uma vez usado no NB2 passa a ser de uso exclusivo da unidade.
2. Estes devem ser retirados ao sair da sala e estão acondicionados nos armários ou cabides da pré-sala.
3. As luvas devem ser substituídas a cada experimento e/ou sempre que retiradas.
4. As Máscaras e os aventais podem ser substituídos sempre que necessário.
5. Ninguém deve permanecer no interior do NB2 a menos que seja necessário.

No NB2 é PROIBIDO:

1. Comer, beber, falar ao telefone ou usar equipamentos eletrônicos desnecessários aos experimentos.
2. A entrada de representantes comerciais, crianças ou animais domésticos.

Comportamento:

1. É proibido o uso de sandálias, chinelos, bermudas, shorts e saias.
2. Evitar conversas desnecessária e falar em frente das estufas abertas.
3. Sempre usar luvas e máscaras para manipular todos os equipamentos e frascos.

OBSERVAÇÕES: Toda manutenção deve ser agendada previamente e a desinfecção do laboratório deve ser repetida após a saída dos técnicos de manutenção.

7.8.1.10. Procedimentos de emergência e descarte de OGMs

Caso ocorra a liberação acidental de OGM no meio ambiente, deve-se procurar imediatamente o responsável do laboratório ou o pesquisador principal para tomar as providências iniciais de contenção que serão definidas caso a caso.

1. No caso de liberação/derramamento de pequenas quantidades de material contendo OGMs, estes podem ser desinfetados com solução de hipoclorito 2% e contidos com toalhas de papel, que devem ser descartadas em lixo biológico (*POP - Procedimentos gerais de derrames de OGM*).
2. Caso o material entre em contato com o corpo do manipulador, a superfície da pele deverá ser lavada com água e sabão desinfetante. Suas vestimentas devem ser retiradas imediatamente e autoclavadas (121 °C, 30 minutos) ou descontaminadas em solução de hipoclorito de sódio 2% antes da lavagem.
3. No caso de liberação/derramamento de grandes quantidade, o pesquisador responsável,

assim como membros da CIBio devem ser notificados imediatamente para que as devidas providências sejam tomadas.

Toda e qualquer ocorrência deverá ser anotada em livro próprio, relatando o material e as pessoas envolvidas, e comunicada à CIBio e à CIPA.

=====

7.8.1.11. Transporte de microrganismos e OGM NB-1 dentro do CENA-USP

Operação para transportar microrganismos e OGMs para fora de laboratórios NB-1 (microrganismos não patogênicos):

1. Usar EPI para o transporte (avental, luvas e máscara, quando necessário). Não é permitido o transporte de OGM sem EPIs dentro do CENA-USP.
2. O microrganismo ou OGM deve estar acondicionado em frascos fechados (p.ex., tubos falcons, erlenmeyers com tampa para cultura).
3. Desinfetar a superfície do frasco com etanol 70% de modo a não permitir a contaminação com o OGM manipulado fora do laboratório.
4. O(s) frasco(s) deve ser transportado para fora do laboratório de forma segura, de preferência, num carrinho. Levar um frasco com solução de hipoclorito 2% para desinfecção, em caso de acidentes (ver abaixo).
5. Em caso de acidentes (quebra do frasco ou vazamentos), utilizar os procedimentos de contenção de OGMs (identificar a área, colocar solução desinfetante, e notificar o docente responsável e a CIBio).

7.8.1.12. Transporte de microrganismos e OGM NB-2 dentro do CENA-USP

Operação para transportar microrganismos e OGMs para fora de laboratórios NB-2 (patogênicos para o homem):

1. Usar EPI para o transporte (avental, luvas e máscara, quando necessário). Não é permitido o transporte de OGM sem EPIs dentro do CENA-USP.
2. O microrganismo ou OGM deve estar acondicionado em frascos fechados (p.ex., tubos falcons, erlenmeyers com tampa para cultura).
3. Desinfetar a superfície do frasco com etanol 70% de modo a não permitir a contaminação com o OGM manipulado fora do laboratório.
4. O frasco contendo o OGM deve ser acomodado dentro de uma caixa de transporte (p.ex., uma caixa de isopor) com tampa, de forma que o frasco seja carregado com segurança.
4. A caixa, contendo o(s) frasco(s) deve ser transportado para fora do laboratório de forma segura, num carrinho. Levar um frasco com solução de hipoclorito 2% para desinfecção, em caso de acidentes (ver abaixo). O ideal é que transporte seja realizado por duas pessoas.
5. Em caso de acidentes (quebra do frasco ou vazamentos), utilizar os procedimentos de contenção de OGMs (identificar a área, colocar solução desinfetante, e notificar o docente responsável e a CIBio).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Manual de Biossegurança da USP:

http://www3.iq.usp.br/uploads/grupos/grupo4/Biosseguran%C3%A7a/Manuais%20de%20Biosseguran%C3%A7a/Manual_Biosseguranca_USP.pdf

Manual de EPIs da USP:

http://www3.iq.usp.br/uploads/grupos/grupo4/Biosseguran%C3%A7a/Manuais%20de%20Biosseguran%C3%A7a/Manual_Utilizacao_EPIs_USP.pdf

Manual de Biossegurança da ANVISA:

http://www3.iq.usp.br/uploads/grupos/grupo4/Biosseguran%C3%A7a/Manuais%20de%20Biosseguran%C3%A7a/Manual_Biosseguranca_ANVISA.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos / Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. – 3. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2010. ISBN 978-85-334-1716-8.

Handbook of Laboratory Safety – CRC Press, Boca Raton, 1971, 2a ed.