

## BIOSSEGURANÇA NO LABORATÓRIO

R. ISHAK (1), A. C. LINHARES (2) & M. O. G. ISHAK (1)

---

### RESUMO

Nos últimos dez anos tem sido travada uma luta com a finalidade de prevenir a transmissão de agentes infecciosos dentro de laboratórios. A grande fonte de dispersão de patógenos por meio de aerossóis, pode ser eliminada satisfatoriamente com o uso de câmaras de segurança biológica. Regras gerais e específicas de biossegurança devem ser cumpridas por todos os usuários de laboratórios que manuseiam patógenos ou materiais potencialmente contaminantes e, eventualmente, avaliados por um comitê de biossegurança independente. O surgimento da síndrome de imunodeficiência adquirida deve servir como fator de estímulo à adoção de normas eficazes de segurança laboratorial.

**UNITERMOS:** Biossegurança: Infecção laboratorial.

---

### INTRODUÇÃO

Prevenir a transmissão de agentes infecciosos, dentre outros produtos nocivos à saúde humana, é o grande problema de segurança laboratorial que deveria ser incutido em todos os usuários iniciantes e nos chamados "experientes" que se utilizam de um espaço de laboratório para o preparo de "inócuas" culturas de células ou a separação de sangue para os mais variados fins ou aqueles que manuseiam patógenos de reconhecida importância médica.

Entretanto, apesar de todos os perigos de contaminação de naturezas infecciosa e química, os riscos potenciais que são enfrentados no dia a dia em um laboratório, na maioria das vezes, são obscuros e silenciosos, e esperam a oportunidade certa de causar o seu dano.

Como itens de segurança geral temos os seguintes a serem considerados:

1. **Vidrarias e objetos perfurantes:** são comuns os acidentes ao colocar-se uma pera ou outro auxiliar de pipetagem na ponta de uma pipeta ou no manuseio de vidrarias quebradas dentro de receptáculos etc. O descarte de agulhas no passado, era efetuado após a cobertura com a respectiva capa. Após o advento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) observou-se que o número de perfurações acidentais provenientes deste ato não estava dentro dos limites aceitáveis. Desta forma é preferível que exista um recipiente adequado e único para o desprezo de agulhas e seringas imediatamente após o uso, sem cobrir a agulha. O desprezo de vidraria quebrada e agulhas deve ser feito em local apropriado que não o lixo geral;
2. **Produtos químicos de natureza tóxica:** detergentes podem ser cáusticos ou causar irrita-

---

(1) Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia, Laboratório de Virologia.

(2) Instituto Evandro Chagas, FSESP/Belém, Pará, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Ricardo Ishak — Caixa Postal 3005 — 66.000 Belém, Pará, Brasil

ção na pele, olhos etc.; desinfetantes químicos como o hipoclorito de sódio podem manchar tecidos, causar irritação na pele ou mesmo corroer metais; produtos químicos comumente usados em cultura de células, como o dimetil sulfóxido, solvente poderoso que penetra através da pele e pode carregar consigo substâncias infecciosas, químicos mutágenos ou carcinogênicos;

3. **Gases:** CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> não são perigosos quando a exposição é feita a pequenas quantidades, porém causam asfixia quando liberados em grandes quantidades; a liberação de O<sub>2</sub> requer ventilação máxima devido ao risco de fogo; a vedação de ampolas deve ser feita com cuidado para não haver refluxo de oxigênio ou defeitos na mistura gás/oxigênio; cilindros que contêm gases devem estar fixos, evitando o risco mecânico de queda dos mesmos;
4. **Nitrogênio líquido:** são três os maiores riscos associados ao nitrogênio — queimadura, asfixia e explosão; quando as ampolas são submersas em N<sub>2</sub> líquido, existe uma diferença de pressão entre o exterior e o interior da ampola; se esta não estiver perfeitamente fechada haverá a entrada de N<sub>2</sub>, a qual causará a explosão da ampola no momento de descongelamento; a inalação de grandes quantidades de N<sub>2</sub> pode levar à asfixia, e devido à baixa temperatura do mesmo o seu manuseio sem luvas de proteção pode resultar em queimaduras;
5. **Fogo:** Bicos de gás e álcool para esterilização devem ser mantidos afastados; a esterilização pelo fogo deve ser feita com cuidado redobrado e o material esterilizado mantido longe do álcool;
6. **Radiação:** o uso de radioisótopos segue regras que devem ser obedecidas com cuidado; seu cumprimento é assegurado por órgãos de fiscalização e que não será objeto de análise no presente artigo. Por outro lado, no trabalho rotineiro, todo cuidado deve ser observado para a proteção contra as irradiações de lâmpadas ultra-violeta na pele e nos olhos; barreiras de vidro ou plástico devem ser sempre utilizadas porque há o risco de lesão de retina e de câncer de pele.

## RISCO BIOLÓGICO DE CONTAMINAÇÃO

A necessidade de proteção contra um risco biológico é definida pela (i) fonte do material; (ii) pela natureza da operação ou experimento a ser efetuado e (iii) pela condição na qual o experimento será realizado. Não há controvérsias sobre o risco de contaminação quando se trabalha com patógenos conhecidos, pois para estes existem normas e classificações que regem os níveis de contenção adequados para os seus manuseios<sup>2, 6</sup>. Entretanto, o desenvolvimento de novas técnicas como a hibridização celular inter-específica, o uso de novos patógenos em locais não considerados como de contenção máxima, o uso de linhagens celulares transformadas, todos introduzem riscos para os quais ainda não se dispõe de informações epidemiológicas suficientes para avaliar o impacto que as modernizações de tecnologia acarretam. As comissões de segurança internacional reúnem-se, em geral, quando se detecta o risco.

É importante então que cada instituição de pesquisa aponte um Comitê de Biossegurança que atue nas seguintes funções:

- a) no aconselhamento para desenvolver e melhorar as regras para a segurança no trabalho;
- b) prover uma revisão geral de biossegurança dentro das atividades desenvolvidas pela instituição em questão sob um ponto de vista rigoroso e imparcial.

É essencial que a responsabilidade com a biossegurança envolva não apenas o cientista coordenando ou realizando um projeto, como também todos os usuários do laboratório, inclusive aqueles do corpo administrativo, os quais também devem obedecer regras específicas.

## CÂMARAS DE SEGURANÇA

Além de regras de ordem prática que devem ser seguidas, a proteção contra a contaminação laboratorial sob a forma de aerossol, é feita primariamente através do uso de câmaras de segurança microbiológica<sup>5</sup>. É essencial que o operador seja protegido, assim como não se permita que seja eliminado qualquer agente ou outro elemento para o meio ambiente.

Inicialmente é importante fazer a distinção entre câmaras de fluxo laminar ordinárias e de segurança.

As câmaras de fluxo laminar ordinárias não são projetadas para dar proteção ao operador. São capelas com pressão positiva, com um fluxo de ar de dentro para fora da área de trabalho da mesma, que não é recirculado e sim eliminado para o interior do laboratório. Estas câmaras de fluxo horizontal dão a proteção adequada para a cultura de células, reagentes etc., porém nunca devem ser utilizadas com radioisótopos, mutágenos, vapores tóxicos, materiais infectantes etc. Até mesmo o simples trabalho de cultura de células pode ser questionado nestas câmaras, em vista da presença de vírus endógenos cuja patogenicidade é desconhecida para o homem.

Existem três tipos de cabines de segurança com projeções e utilizações diferentes, graduadas em classes de acordo com o grau de segurança proporcionado:

**Classe I** — possuem um fluxo de ar de fora para dentro e protegem apenas o operador, não mantendo a esterilidade dos reagentes trabalhados;

**Classe II** — é projetada para proteger o operador e material trabalhado, possuindo um fluxo de ar estéril em direção ao espaço do trabalho e um fluxo de ar de fora para dentro entrando por uma abertura frontal;

**Classe III** — teoricamente são cabines de contenção máxima para usos de patógenos de alta periculosidade (e.g., varíola, febre de Lassa, raiva, HIV etc.); são projetadas com luvas fixas na parte frontal, formando uma barreira física entre o material e o operador.

Atualmente existem Padrões de Segurança definidos em países como os EUA, Inglaterra, Austrália, Alemanha Oriental e Japão<sup>4</sup>. O padrão definido na Inglaterra exige que o operador que trabalha em uma cabine Classe I ou II tenha uma exposição a aerossóis em uma quantidade que não ultrapasse  $10^{-5}$  da exposição que teria a qualquer aerossol infeccioso produzido se o trabalho fosse efetuado em um balcão de laboratório sem qualquer mecanismo auxiliar de contenção<sup>1</sup>.

Convém lembrar de que estas cabines são suscetíveis à influência do meio externo, na qual movimentos do operador, de portas, pessoas ao redor, causam distúrbios no fluxo de ar, podendo levar contaminantes para o interior, assim como trazer patógenos para o operador e visitantes inesperados e circunstanciais. Uma das formas de corrigir tais ocorrências é a colocação das Câmaras em lugares adequados no laboratório, colocar portas de correr, efetuar vedações absolutas, observar normas de segurança etc.

A manutenção de salas com pressão negativa ou um pouco abaixo (2-3mm de Hg) das salas ao redor são práticas adequadas para aumentar a segurança de câmaras assépticas a fim de evitar a saída de qualquer espécimen sendo manuseado para o meio externo<sup>3</sup>.

Além destas câmaras, existem ainda aquelas produzidas para o trabalho com produtos tóxicos, carcinogênicos e radioisótopos, as capelas químicas. São câmaras que devem obedecer o grau de segurança daquelas de Classe II e dotadas principalmente de uma abertura frontal mínima, fluxo de água e boa ventilação.

A instalação e teste de câmaras de segurança devem ser criteriosamente estudadas e avaliadas de tempo em tempo, para se ter certeza que o funcionamento está correto.

## NÍVEIS DE CONTENÇÃO LABORATORIAL

Os trabalhos executados em laboratório, obedecem a um gradiente de periculosidade de acordo com o patógeno que está sendo manuseado. Desta forma, costuma-se admitir quatro níveis de contenção laboratorial:

**Nível 1 (Mínimo):** adequado para patógenos com nível mínimo de risco para o operador; o trabalho é feito em geral em balcão aberto sem nenhum equipamento especial de contenção requerido. Há necessidade de se observar algumas práticas como: manter as portas fechadas, descontaminar superfícies diariamente, descontaminar material a ser lavado ou descartado, proibir comida, bebida, fumo, pipetagem com a boca, evitar a formação de aerossol etc.

**Nível 2 (Baixo risco):** o pessoal técnico deve ser mais treinado para manusear patógenos, o

acesso ao laboratório é limitado quando da manipulação com microorganismos e os procedimentos capazes de produzir aerossol devem ser efetuados em câmaras de segurança. Adicionalmente deve-se fazer um programa eficaz de controle de insetos e outros animais, não utilizar jalecos fora da área laboratorial, não manter plantas, agulhas e lixo no interior do laboratório, assim como criar um sistema de notificação e registro de acidentes no laboratório, de exposição aos patógenos trabalhados e de vigilância médica vinculada principalmente aos casos de absenteísmo posterior aos acidentes e/ou exposições a agentes patogênicos.

**Nível 3 (Risco moderado):** o laboratório já deve possuir uma arquitetura especial e equipamento de contenção adequada para o manuseio de patógenos potencialmente letais. Todo material deve ser esterilizado dentro da área laboratorial ou enviado em frascos à prova de vazamento para uma unidade de esterilização. Não deve ser permitida a entrada de pessoas estranhas ao serviço, as quais devem ser orientadas sobre o risco de contaminação; deve-se criar protocolos escritos para as situações de emergência; a descontaminação tem de ser eficaz; não usar roupas de rua e cobrir-se até os sapatos (de preferência com botas à prova d'água); uso obrigatório de luvas e máscaras (especialmente em biotérios); e usar filtros nas linhas de vácuo.

**Nível 4 (Alto Risco):** o pessoal do laboratório deve ter conhecimento e treinamento completo no manuseio de patógenos sabidamente capazes de produzir doença severa ou fatal no homem, assim como devem compreender as funções dos níveis de contenção, do equipamento e das características do laboratório. Esta área deve ser claramente demarcada dentro de um espaço físico. O uso de Câmaras Classes I ou II pode ser feito apenas se todos os usuários mostrarem evidência de imunização anterior ao agente em questão, de outra forma, a manipulação de patógenos requer Câmaras de Classe III ou roupas especiais pressurizadas.

Em uma contenção de Nível 4 as portas devem ser mantidas fechadas e o número de chaves limitado estritamente aos usuários. À entrada e saída, deve haver troca de roupa e banho em uma ante-sala que permita este fluxo de pessoas. Deve haver um espaço para quarentena e obser-

vação de operadores suspeitos de contaminação e suporte médico de casos potenciais ou confirmados de doença associada ao laboratório. Todo material saído deste nível de contenção tem obrigatoriamente de ser esterilizado (UV, calor, banho químico) ou filtrado (ar).

### PRECAUÇÕES EM BIOSSEGURANÇA

Todo indivíduo trabalhando com agentes infecciosos ou material suspeito de conter patógenos está exposto ao risco de infecção. Daí é importante que precauções apropriadas sejam tomadas, já que mesmo uma cultura de células não inoculada pode ser uma fonte de patógenos virais. É aconselhável que todo o pessoal de laboratório tenha uma amostra de sangue coletada anualmente.

### REGRAS GERAIS DE BIOSSEGURANÇA

1. Todo material contaminado deve ser marcado apropriadamente e esterilizado por autoclave, ou UV (superfícies e ar). A contaminação do sistema hidráulico por agentes infecciosos não pode ocorrer.
2. Devem existir em estoque, próximas do local de trabalho, soluções de desinfetantes, incluindo-se formalina a 20% e etanol a 70%.
3. Gaiolas com animais, garrafas de água e restos de animais assim como ovos infectados devem ser autoclavados e os técnicos que trabalham com tal material devem ser instruídos a seguir fielmente as normas de segurança.
4. Todas as vacinas disponíveis devem ser criteriosamente utilizadas para os operadores e usuários do laboratório

### REGRAS ESPECÍFICAS DE BIOSSEGURANÇA

- Manter todos os frascos contendo material infectante fechados quando não estiverem em uso;
- Não colocar pipetas contaminadas na superfície do balcão de trabalho; não andar com pipetas pelo laboratório; não descartar fluidos contaminados na pia; não causar derramamento de material;
- Não produzir aerossol desnecessariamente (maceração com gral e pistilo, agitação violenta, sonicação, abertura de vasilhames com

pressão interna maior que a ambiente, inoculação de animais por via intra-nasal, coleta de fluidos de animais ou de ovos embrionados etc.);

- Não pipetar com a boca;
- Não comer, beber ou fumar no laboratório ou estocar comida ou bebida nos refrigeradores ou locais de área técnica;
- Não levar luva para fora da área de trabalho, e lavar as mãos antes de sair do laboratório;
- Vestir jalecos no local de trabalho, mas trocá-los antes de sair;
- Desinfectar os balcões ao final do dia;
- Urina, fezes, sangue total, plasma, soro e outros fluidos orgânicos devem ser considerados como material contaminado até prova em contrário. Em virtude disto, evite sujar-se com qualquer destes materiais;
- Lavar sempre com água e sabão a parte do corpo imediatamente após o contato com qualquer espécimen do laboratório;
- Cobrir cortes e abrasões de pele, principalmente das mãos, antes de manusear qualquer espécimen laboratorial;
- Evitar perfurações com agulhas e outros objetos pontiagudos, principalmente aqueles sujos com sangue; substituí-los, eventualmente, por instrumentos plásticos;
- Não colocar recipientes contendo substâncias líquidas ou qualquer outro objeto, por mais leve que seja, sobre o equipamento de laboratório, para se evitar problemas que incluem danos elétricos e obstrução da ventilação;
- Despejar todo o material de análise de forma segura, esterilizando tudo o que for necessário;
- Você deve ter consciência da sua segurança em seu local de trabalho. Não acredite que seu trabalho é inócuo só porque você ainda não foi infectado no laboratório. Um dia isto pode acontecer, e o que é pior, pode ser fatal. Tenha cuidado!

## BIOSSEGURANÇA E A SÍNDROME DE IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA

As normas aqui propostas assumem particular relevância quando se observa a acelerada expansão da SIDA/AIDS no mundo e constituem um apanhado geral de regras largamente difundidas.

Qualquer unidade laboratorial que se utilize de fluidos orgânicos como o sangue ou porções do mesmo, está em risco de se ver um dia frente ao manuseio de espécimens contaminados pelo HIV. Desta forma, mais do que nunca é essencial que as normas de segurança aqui delineadas, e outras particulares de cada laboratório, sejam fielmente respeitadas e seguidas.

Por outro lado, o trabalho com pacientes soropositivos para o HIV ou com a SIDA/AIDS, requer que sejam estabelecidas regras mínimas complementares para bloquear a transmissão ao operador. Desta forma, o trabalho com o HIV deverá obedecer:

- a notificação da existência de um trabalho desta natureza para fins de avaliação por um Comitê independente;
- a existência de mecanismos de contenção e prevenção da infecção, tais como: a sinalização do perigo biológico, a presença de fonte de água de fácil acesso, desinfetantes próximos ao local de trabalho, equipamento de uso exclusivo como geladeira, centrifuga etc.;
- uma rotina rígida de trabalho limitando o acesso de usuários, mantendo portas fechadas, prevendo a sistemática utilização de jalecos, aventais plásticos, óculos de proteção, luvas e dando o descarte adequado ao material infectante após sua esterilização;
- cuidados específicos a serem seguidos para o derramamento de material e seu descarte adequado: são recomendadas concentrações variáveis de hipoclorito para a descontaminação e limpeza de materiais variados como pipetas, ponteiras (hipoclorito a 0,25%), superfícies, objetos e equipamentos (hipoclorito a 0,1% ou glutaraldeído a 2%). Contaminações grosseiras devem ser limpas com solução de hipoclorito a 1%; é essencial o uso de cubas fechadas para autoclavagem;

- manutenção de livro de ocorrência para registro de acidentes, infecções, doenças, assistência médica etc.;
- orientação correta para recebimento de materiais de outros laboratórios; nunca é demais lembrar que a vedação dos frascos contendo soros para teste deve ser completa e que os frascos devem ser embalados em sacos plásticos individuais antes de serem enviados;
- limpeza diária do laboratório.

Reenfatizamos o cuidado quanto ao uso de seringas e agulhas, particularmente no momento da colheita do sangue: **NUNCA** tentar repor a capa de plástico que originalmente recobria a agulha; uma vez coletado o espécimen, deposite-o em um frasco apropriado, injetando-o através da agulha; ao término desse último procedimento, descartar a seringa acoplada à agulha (**NÃO TENTE SEPARÁ-LOS! É DESNECESSÁRIO...**) em um recipiente apropriado (e.g., uma caixa de papelão suficientemente rígido) cujo destino será a cremação.

Por último convém enfatizar que mais importante que a contenção física do laboratório para evitarem-se os acidentes, são as práticas seguras que devem ser seguidas pelo pessoal de laboratório. As pessoas que trabalham no laboratório devem entender todos os procedimentos, funcionamento dos equipamentos e as instalações, assim como devem saber da natureza dos agentes infecciosos, carcinogênicos ou emissores de radiações que são manipulados e as consequências da sua manipulação errônea, displicente, despreocupada e irresponsável.

## SUMMARY

### LABORATORY SAFETY

The occurrence of laboratory-acquired infections have elicited in the last ten years an intense

interest in methods and procedures for the safe handling of microbiological material. The major laboratory safety problem is aerial transmission, however, protection against airborne hazards is efficiently achieved by the use of microbiological safety cabinets. Biosafety rules should be strictly followed by all members of a laboratory. Evaluation of these procedures should be effectively performed by an independent biosafety committee. The upsurge of AIDS should stimulate the adoption of safe working procedures in the laboratory.

## AGRADECIMENTOS

À Sra. FÁTIMA MONTEIRO pela paciente datilografia do manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **BRITISH Standard 5726.** Specifications for microbiological safety cabinets. London, British Standards Institution, 1979.
2. **CASALS, J.** — Arboviruses, arenaviruses and hepatitis. In: **HELMAN, A.; OXMAN, M. N. & POLLACK, R., ed.** — **Biohazards in biological research.** Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1973. p. 223-245.
3. **CLARK, R. P.** — Containment facilities for pathological material. *Environ. Int.*, 8: 387-394, 1982.
4. **CLARK, R. P.** — The performance of containment facilities. *J. Soc. environ. Engin.*, 21: 31-35, 1982.
5. **CLARK, R. P.** — Airborne hazards in the laboratory. *Nature*, 301: 15-16, 1983.
6. **LABORATORY safety for arboviruses and certain other viruses of vertebrates.** The Subcommittee on Arbovirus Laboratory Safety of the American Committee on Arthropod borne Viruses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 29: 1359-1381, 1980.

Recebido para publicação em 08/8/1988