

A photograph of a petri dish containing a bacterial culture. The agar surface is covered with numerous small, circular colonies of varying colors, including yellow, orange, and red. The background is a dark, textured surface.

MICROBIOLOGIA

UNIDADES 1 & 2

Monitoras: Amanda e Tainan

CAPÍTULO 1 – NORMAS DE BIOSSEGURANÇA EM LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA

O QUE BUSCAREMOS APRENDER NESSE CAPÍTULO?



1. Apresentar a história da biossegurança no mundo e no Brasil
2. Mostrar algumas definições para biossegurança
3. Explicar os Níveis de Biossegurança
4. Apresentar as normas de conduta em laboratórios de Microbiologia
5. Demonstrar os símbolos utilizados em laboratórios.

1. Introdução

Até chegarmos aos conceitos de biossegurança que temos atualmente, precisamos encontrar o nosso ponto de partida.

- **1970** o foco voltava-se para a **saúde do trabalhador** frente aos **riscos biológicos** no ambiente ocupacional. OMS: a definição de biossegurança tratava-se de "**práticas preventivas** para o trabalho em contenção a nível laboratorial, com agentes patogênicos para o homem".
- **1980**, a própria OMS (WHO, 2004) incorporou a essa definição os chamados **riscos periféricos** presentes em ambientes laboratoriais que trabalhavam com agentes patogênicos para o homem, como os riscos químicos, físicos, radioativos e ergonômicos..
- **1990**, a definição de biossegurança sofre **mudanças significativas**, em seminário realizado no Instituto Pasteur em Paris (INSERM, 1991), observa-se a inclusão de temas como **ética em pesquisa, meio ambiente, animais e processos envolvendo tecnologia de DNA recombinante, em programas de biossegurança**.

Construção do conceito de Biossegurança teve seu início na **década de 1970** na reunião de **Asilomar na Califórnia**.

A comunidade científica discutiu sobre os impactos da engenharia genética na sociedade.

E como ficou nossa linha do tempo?



Nisso, segundo Goldim (1997), "é um marco na história da ética aplicada à pesquisa, pois foi a primeira vez que se debateu os aspectos de **proteção aos pesquisadores e demais profissionais envolvidos** nas áreas onde se realiza o projeto de pesquisa"

MAIS QUAL É A DEFINIÇÃO DO CONCEITO DE BIOSSEGURANÇA?



é um processo funcional e operacional de fundamental importância em serviços de saúde, uma vez que aborda medidas de controle de infecções para a proteção da equipe de assistência e usuários em saúde, reduzindo os riscos à saúde e acidentes ocupacionais, bem como exerce um papel fundamental na promoção da consciência sanitária e preservação do meio ambiente, já que estipula normas sobre a manipulação e descarte de resíduos químicos, tóxicos e infectantes

ALGUMAS DEFINIÇÕES NÃO TERMINAM POR AQUI:

UMA DEFINIÇÃO BASEADA NA CULTURA DA ENGENHARIA DE SEGURANÇA E DA MEDICINA DO TRABALHO:

COSTA (1998), ONDE APARECE COMO “CONJUNTO DE MEDIDAS TÉCNICAS, ADMINISTRATIVAS, EDUCACIONAIS, MÉDICAS E PSICOLÓGICAS, EMPREGADAS PARA PREVENIR ACIDENTES EM AMBIENTES BIOTECNOLÓGICOS”.

EIXEIRA; VALLE, 1996 DIZEM QUE “A BIOSSEGURANÇA É O CONJUNTO DE AÇÕES VOLTADAS PARA A PREVENÇÃO, MINIMIZAÇÃO OU ELIMINAÇÃO DE RISCOS INERENTES ÀS ATIVIDADES DE PESQUISA, PRODUÇÃO, ENSINO, DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E PRESTAÇÃO DE SERVIÇOS, VISANDO À SAÚDE DO HOMEM, DOS ANIMAIS, A PRESERVAÇÃO DO MEIO AMBIENTE E A QUALIDADE DOS RESULTADOS.”

A BIOSSEGURANÇA É UM PROCESSO PROGRESSIVO, DEVE SER SEMPRE ATUALIZADO, SUPERVISIONADO E SUJEITO À EXIGÊNCIAS DE RESPOSTAS IMEDIATAS AO SURGIMENTO DE MICRO-ORGANISMOS MAIS RESISTENTES E AGRESSIVOS IDENTIFICADOS PELAS NOTIFICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS.

Este foco de atenção retorna ao ambiente ocupacional e amplia-se para a proteção ambiental e a qualidade



NÍVEIS DE BIOSSEGURANÇA

1º: O nível de biossegurança de um experimento será determinado segundo o organismo de maior classe de risco envolvido no experimento.

Existem quatro níveis de biossegurança: **NB-1, NB-2, NB-3 e NB-4**, crescentes no maior grau de contenção e complexidade do nível de proteção (definidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC))



Importante

Os níveis são designados em ordem crescente, pelo grau de proteção proporcionado ao **pessoal do laboratório, meio ambiente e à comunidade.**

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA 1 (NB-1)

- ❑ é adequado ao trabalho que envolva agentes bem caracterizados e conhecidos por **não provocarem doença em seres humanos saudáveis** e que possuam **mínimo risco ao pessoal do laboratório e ao meio ambiente**.

LABORATÓRIOS DE ENSINO, MAS POR QUÊ?

- ✓ Não é requerido nenhum tipo de desenho especial das instalações.
- ✓ O laboratório não está separado das demais dependências da edificação.
- ✓ O trabalho é conduzido, em geral, em bancada, com adoção das boas práticas laboratoriais (BPL).
- ✓ Equipamentos específicos de proteção ou características especiais de construção não são geralmente usados ou exigidos.

O PESSOAL DO LABORATÓRIO DEVE TER TREINAMENTO ESPECÍFICO NOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS NA BANCADA E DEVEM SER SUPERVISIONADOS POR UM PROFISSIONAL TREINADO EM BIOSSEGURANÇA E COM CONHECIMENTOS ESPECÍFICOS DA ÁREA.

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA 1 (NB1)



Dica

Esse nível se aplica aos laboratórios de ensino básico, onde são manipulados os micro-organismos pertencentes a Classe de Risco 1, por exemplo o *Bacillus subtilis*.

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA 2 (NB-2)

- ❑ É adequado ao trabalho que envolva agentes de **risco moderado para as pessoas** e para o **meio ambiente**, classificados como micro-organismos da Classe de Risco 2 (seus representantes incluem a maioria das bactérias: *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, Fungos: *Aspergillus* e *Penicillium* e Vírus: Rotavírus e Adenovírus).

LABORATÓRIOS CLÍNICOS OU HOSPITALARES, MAS POR QUÊ?

1. o pessoal de laboratório deverá ter um **treinamento específico no manejo de agentes patogênicos** e deve ser **supervisionado por profissionais competentes**;
2. o **acesso** ao laboratório deve ser **limitado durante os procedimentos operacionais**;
3. **precauções** extremas serão tomadas em relação a **objetos perfurocortantes infectados**;
4. determinados procedimentos nos quais exista possibilidade de **formação de aerossóis** e **borrifos** infecciosos devem ser conduzidos em **cabines de segurança biológica** ou outros equipamentos de **contenção física**

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA 2 (NB2)



Dica

Esse nível aplica-se as laboratórios clínicos ou hospitalares de níveis primários de diagnóstico.

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA 3 (NB-3)

- ❑ O laboratório de nível de Biossegurança 3, ou de **contenção**, destina-se ao trabalho com agentes de **risco biológico da classe 3**, ou seja, micro-organismos que **acarretam elevado risco individual e baixo risco para a comunidade**, como por exemplo o Vírus da Encefalite equina venezuelana e Mycobacterium tuberculosis

LABORATÓRIOS CLÍNICOS DE DIAGNÓSTICO, ENSINO E PESQUISA

A equipe profissional deve possuir treinamento específico no manejo de agentes patogênicos, potencialmente letais, devendo ser supervisionada por profissional altamente capacitado e que possua vasta experiência com estes agentes.

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA 3 (NB3)



Dica

É aplicável para laboratórios clínicos, de diagnóstico, ensino e pesquisa ou de produção onde o trabalho com agentes exóticos possam causar doenças sérias ou potencialmente fatais, como resultado de exposição por inalação.

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA 4 (NB-4)

- ❑ O NB-4 é indicado para o trabalho que **envolva agentes exóticos e perigosos que exponham o indivíduo a um alto risco de contaminação de infecções** que podem ser fatais, além de apresentarem potencial elevado de transmissão por aerossóis. Manipula-se micro-organismos da classe de risco 4, por exemplo o Vírus Marburg e o Vírus Ebola.

LABORATÓRIOS DE CONTENÇÃO

- ✓ só funcionem sob o controle direto das autoridades sanitárias, além disso, dada a grande complexidade do trabalho, a equipe do laboratório deverá ter treinamento específico e completo direcionado para a manipulação de agentes infecciosos extremamente perigosos.
- ✓ É necessária a elaboração de manual de trabalho pormenorizado; este deve ser testado previamente através de exercícios de treinamento.
- ✓ O acesso ao laboratório deve ser rigorosamente controlado por sistemas automatizados.
- ✓ A instalação laboratorial deve estar localizada em uma edificação separada ou em uma área controlada dentro do edifício, que seja totalmente isolada de todas as outras.

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA 4 (NB4)



Dica

Só deve operar com técnicos especializados e treinados em procedimentos de Biossegurança

LABORATÓRIOS NOS NÍVEIS DE BIOSSEGURANÇA

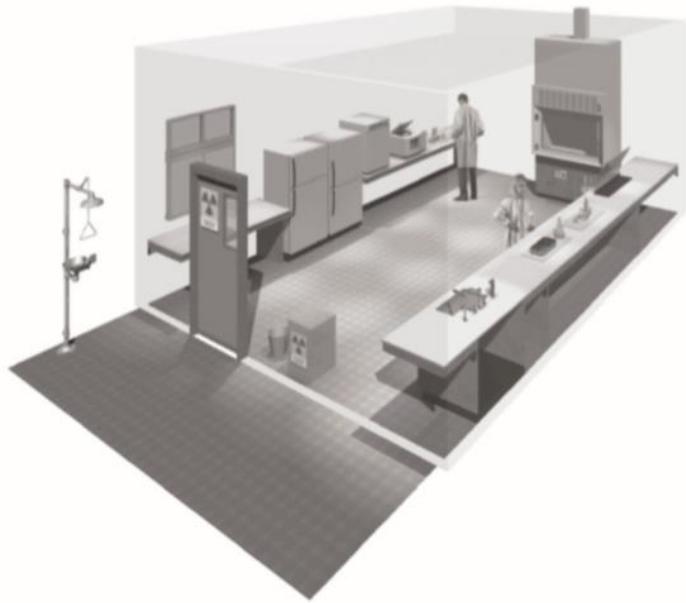


Figura 1 – Típico laboratório NB1

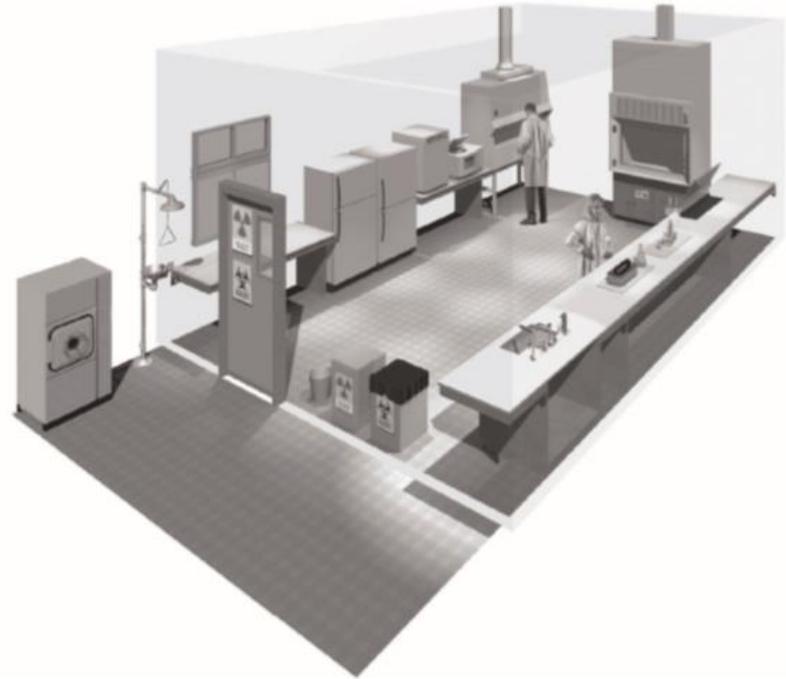
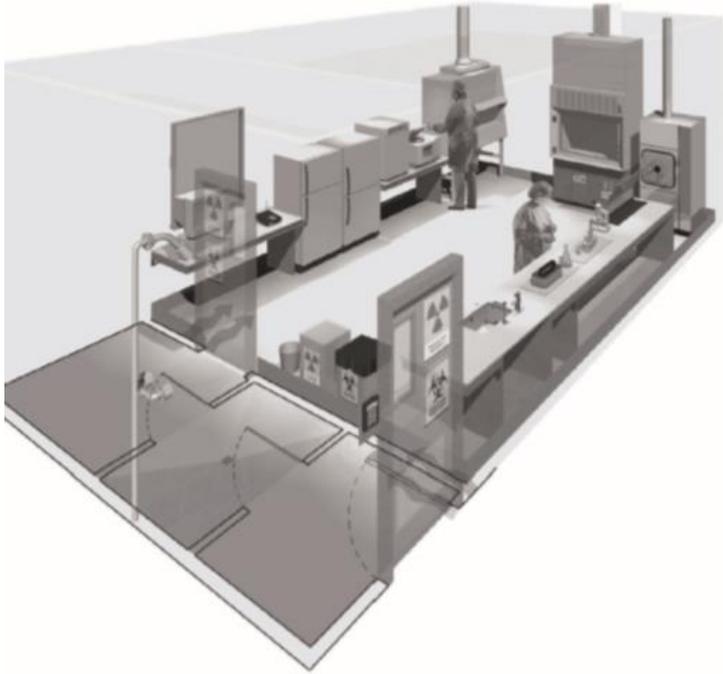


Figura 2 – Típico laboratório NB2

LABORATÓRIOS NOS NÍVEIS DE BIOSSEGURANÇA



nível de Biossegurança 3



NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA 4 (NB4)



BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS (BPL)

é um sistema da qualidade relativo ao processo organizacional e às condições sob as quais estudos não-clínicos referentes a saúde e meio ambiente são planejados, realizados, monitorados, registrados, arquivados e relatados.



1. Medidas e Equipamentos de Proteção Individual e Coletiva (EPI's e EPC's)

Os acidentes são evitados com a aplicação de medidas específicas de segurança, selecionadas de forma a estabelecer maior eficácia na prática. As prioridades são:

- **Eliminação do risco**
- **Neutralização do risco.**
- **Sinalização do risco**

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL OU EPI'S

- ✓ são quaisquer meios ou dispositivos destinados a ser utilizados por uma pessoa contra possíveis riscos ameaçadores da sua saúde ou segurança durante o exercício de uma determinada atividade.

Os principais EPI's são:

- Avental ou jaleco de algodão, de mangas compridas e punho retrátil;
- Máscara com filtro apropriado;
- Luvas de proteção;
- Protetor facial;
- Pipetador automático;
- Pêra de borracha;
- Óculos de proteção.



EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO COLETIVA, OU EPC'S

- ✓ são equipamentos utilizados para proteção, enquanto um grupo de pessoas realiza determinada atividade, ou exercício.

Os principais EPC's são:

- Extintores de incêndio;
- Chuveiro de Segurança;
- Lava olhos;
- Pia para lavagem das mãos;
- Cabine de Segurança Biológica;
- Capelas de Exaustão;
- Caixa de primeiros socorros;
- Recipientes especiais para transporte de material.



Chuveiro de emergência e lavas-olhos

NORMAS DE
CONDUTA EM
LABORATÓRIO DE
MICROBIOLOGIA

- 1.O uso de jaleco, calça comprida e sapato fechado são obrigatórios;
2. Cabelos longos devem ser amarrados de forma a não interferir com reagentes e equipamentos;
- 3.Limpar e desinfetar a superfície das bancadas antes e depois do uso;
- 4.Lavar as mãos, com água e sabão, ao iniciar o experimento, ao sair do laboratório e sempre que for necessário. Se for portador de algum ferimento nas mãos procurar não tocar no material e usar obrigatoriamente luvas;
- 5.Identificar as amostras biológicas, bem como todo o material a ser utilizado nos experimentos antes de iniciar as análises;
- 6.Utilizar exclusivamente material estéril;
7. No caso de derramamento de material contaminado, proceder imediatamente a desinfecção das superfícies com álcool a 70% ou formol a 10% e antissepsia dos tecidos vivos com solução iodada a 2%. O mesmo procedimento deverá ser repetido se ocorrer ferimentos ou cortes.
- 8.Não comer, beber, se maquiar ou fumar no laboratório;

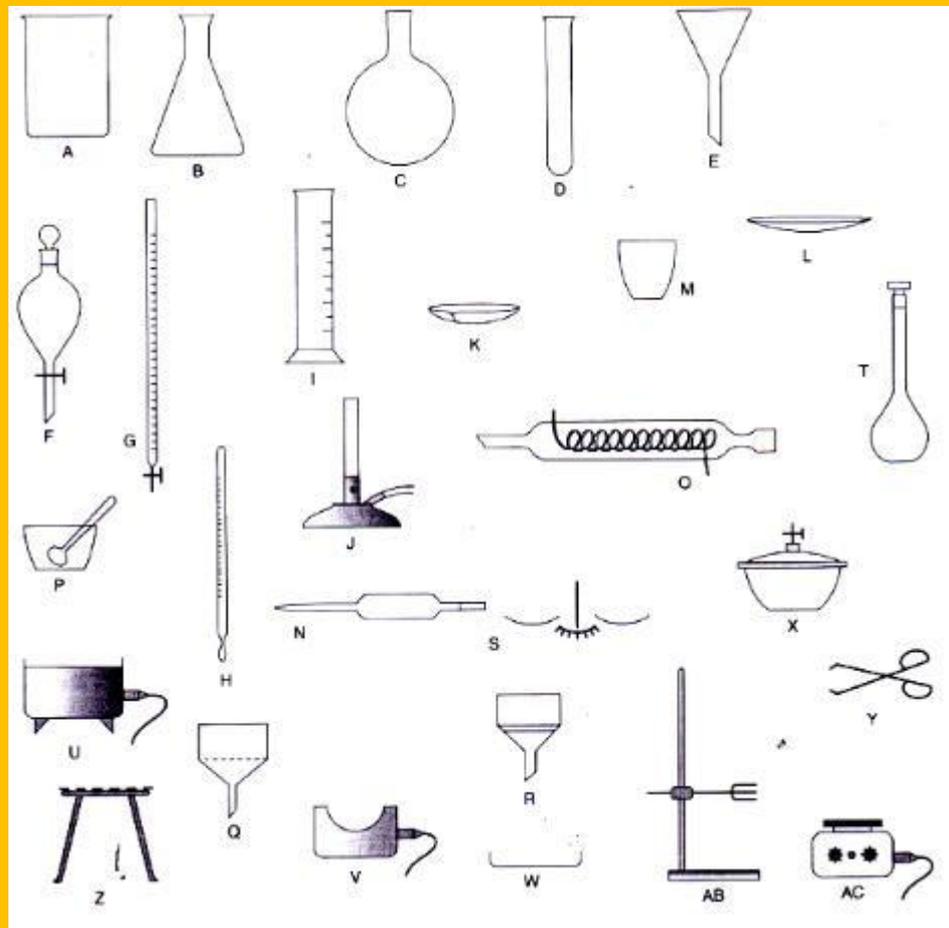
9. Manter canetas, dedos e outros objetos longe da boca;
10. Não utilizar material de uso pessoal para limpar os objetos de trabalho;
11. Avisar ao Professor e/ou ao Monitor em caso de contaminação acidental;
12. Depositar todo material utilizado em recipiente de descarte adequado, jamais os deixando sobre a bancada;
13. Flambar alças, agulhas e pinças metálicas antes e após o uso;
14. Após a leitura das placas cultivadas, colocá-las em recipiente próprio para descarte;
15. Ao acender o bico de Bunsen, verificar se não há vazamento de gás ou substâncias inflamáveis por perto. Não deixar papel sobre as bancadas;
16. Trabalha sempre com a chama do bico de Bunsen entre você e o material biológico;
17. O laboratório é um local de trabalho que exige calma e tranquilidade, portanto converse apenas o necessário para a compreensão dos assuntos inerentes a cada aula prática

SINALIZAÇÃO DE LABORATÓRIO

Tabela de cores para sinais

COR	SIGNIFICADO	INDICAÇÕES
Vermelho	Sinal de Proibição	Atitudes perigosas
	Perigo – Alarme	Stop, pausa, dispositivos de corte de emergência
	Material e equipamento de combate a incêndios	Indicação e localização
Amarelo ou Alaranjado	Sinal de Aviso	Atenção, precaução e verificação
Azul	Sinal de Obrigação	Comportamento ou ação específica, obrigação de utilizar EPI's
Verde	Sinal de Salvamento ou de Socorro	Portas, saídas, vias, materiais, postos, locais específicos
	Situação de Segurança	Retorno à normalidade

VIDRARIAS E EQUIPAMENTOS CAPÍTULO 2



CAPÍTULO 2 – VIDRARIAS E EQUIPAMENTOS

O QUE BUSCAREMOS APRENDER NESSE CAPÍTULO?



1. Mostrar as vidrarias, utensílios e equipamentos comumente encontrados em um laboratório de Microbiologia.
2. Demonstrar os procedimentos adequados para lavagem, secagem e preparo das vidrarias utilizadas nas aulas práticas.

LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

As vidrarias clássicas, como **béquer**, **tubos de ensaio**, **pipetas**, entre outros, são essenciais em qualquer laboratório.

- ✓ Sendo importante saber a utilidade das vidrarias, e com ela, o seu grau de exatidão. Aferir o volume em um balão volumétrico ou proveta é muito mais fácil e preciso quando comparado a um béquer, por exemplo

Alguns utensílios também são utilizados, **como a alça bacteriológica e pisseta**, sendo também importantes para a realização das atividades de rotina.



Esse tipo de laboratório trabalha com diversos micro-organismos, patogênicos ou não, para as mais diferentes finalidades, sendo geralmente amplos e bem estruturados. .

NOS LABORATÓRIOS QUE MANIPULAM MICRO-ORGANISMOS É NECESSÁRIO QUE ESTES POSSUAM ALGUNS EQUIPAMENTOS ESSENCIAIS PARA O CULTIVO, ESTUDO E MANUTENÇÃO DOS MESMOS, TAIS COMO: ESTUFA, AUTOCLAVE E DEPENDENDO DO TIPO DE PESQUISA, O MESMO PODE TER TAMBÉM EQUIPAMENTOS MAIS SOFISTICADOS, COMO TERMOCICLADORES E ESPECTROFOTÔMETROS, MUITO USADOS EM PESQUISAS NA ÁREA DE BIOLOGIA MOLECULAR DE MICRO-ORGANISMOS



estufa e autoclave

Estufas para laboratórios têm objetivo de acumular e conter o calor ou o resfriamento no seu interior, mantendo assim a temperatura adequada para os conteúdos nelas guardadas, por isso é de extrema importância em qualquer laboratório. As **estufas** contêm um termômetro do lado de fora que mantém a temperatura adequada sem alterações involuntárias.

Autoclave: função esterilizar materiais através do vapor sob a pressão.



termocicladores

para realização de técnicas de PCR, amplificação de DNA, entre outras análises. Apresenta excelente precisão e uniformidade, sendo muito utilizado em laboratórios de biologia molecular, de genética e de biotecnologia.



espectrofotômetro

é um aparelho que mede e compara a quantidade de luz absorvida por uma solução. Desse modo, o dispositivo identifica e determina a concentração de substâncias que realizam a absorção de energia radiante.

NA TABELA 1, ESTÃO LISTADAS ALGUMAS VIDRARIAS E UTENSÍLIOS UTILIZADOS EM UM LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA

Vidrarías e utensílios utilizados em um laboratório de Microbiologia	
Vidrarías	Utensílios
Béquer	Agulha de platina
Bastão de vidro	Alça bacteriológica
Kitassato	Bisturi
Balão volumétrico	Caçapas de plástico
Erlenmeyer ¹	Estantes para tubos de ensaio
Pipetas	Garfo de platina
Pistilo e almofariz	Lamparina
Placa de Petri ²	Lâminas de corte
Proveta	Pêra
Tubos de ensaio	Pisseta

NA TABELA 2, ESTÃO LISTADOS OS PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS.

Tabela 2

Equipamentos encontrados em um laboratório de Microbiologia	
Equipamentos	Equipamentos
Agitador magnético ³	Estufa Bacteriológica
Autoclave	Estufa de Esterilização
Balança analítica e/ou semi-analítica	Estufas de Secagem
Bico de Bunsen	Geladeira
Bomba de vácuo	Manta aquecedora
Cabines de Segurança Biológica	Microondas
Centrífuga	Microscópio
Contador de Colônias	pHmetro
Espectrofotômetro	Termociclador

PROCEDIMENTOS

LAVAGEM DE VIDRARIAS

- Todas as vidrarias utilizadas em um laboratório devem ser lavadas inicialmente com **água e sabão neutro**.
-

Em algumas ocasiões, se faz o uso de **soluções químicas**, como as soluções sulfocrômica, potassa alcoólica e a sulfonítrica. Comumente ainda se usa a solução sulfocrômica, apesar de comprovadamente levar ao desenvolvimento de câncer, além de causar impactos ambientais.



Esta solução deve ficar em contato com a vidraria a ser lavada por um período de tempo variável em função do grau de contaminação do mesmo. Assim, vidrarias relativamente limpas necessitam apenas de alguns minutos, enquanto que, se houver resíduos, talvez seja necessário deixar toda uma noite. Devido sua **intensa ação corrosiva, é de boa prática colocar o frasco de solução em bandeja de vidro, chumbo ou revestida com chumbo, e em seguida, lavar com água destilada.**

LAVAGEM DE VIDRARIAS

- Descarte e Esterilização

Outro ponto importante na rotina de um laboratório de Microbiologia é saber quando, onde e como **descartar materiais contaminados**, bem como assegurar que todos os itens necessários à pesquisa ou rotina sejam **esterilizados**.

Tubos de ensaio e/ou placas de Petri contendo amostras biológicas devem ser sempre esterilizados, visando matar os micro-organismos presentes antes da limpeza. **O melhor método para esterilizar culturas é autoclavar** a 121 °C por 30 minutos. Depois que os tubos e/ou placas forem esvaziados, devem ser **escovados com sabão neutro e água corrente, e lavados com água destilada**

Em laboratórios que não possuem autoclave, o descarte de micro-organismos pode ser feito colocando-se o material em contato com formol a 10% por aproximadamente 24 horas, garantindo então, que as culturas presentes nos tubos ou placas sejam mortas



SECAGEM DA VIDRARIA

A vidraria lavada deverá ser colocada em estufa de secagem a 70 °C e posteriormente deve ser devidamente montada para esterilização.

Pode-se optar pela secagem natural. Neste caso a vidraria lavada deve ser colocada em bandejas e deixada à temperatura ambiente até a completa evaporação de água.



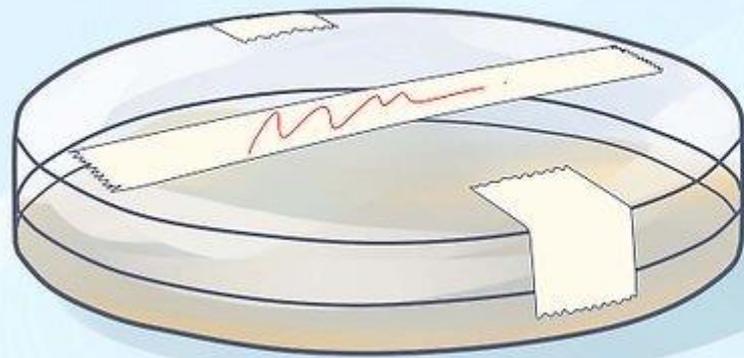


PREPARO E MONTAGEM DO MATERIAL

A montagem do material consiste na preparação do mesmo para a esterilização, evitando sua contaminação após o processo

PLACAS DE PETRI

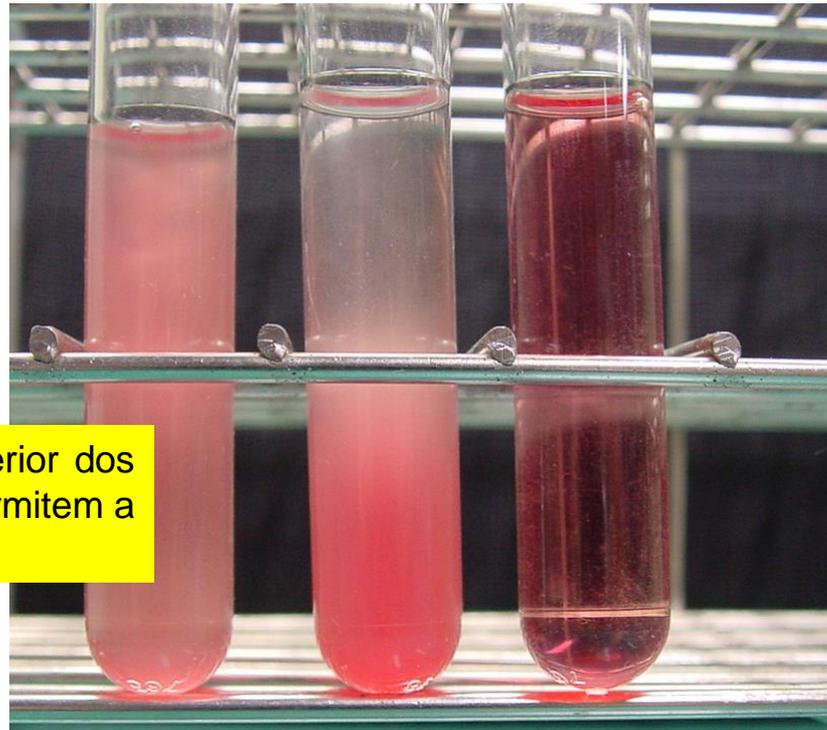
devem ser montadas e embrulhadas em papel madeira e barbante e/ou fita adesiva, identificando-se a data, quantidade, tamanho das placas, e ocasionalmente, o nome do responsável pela montagem.



TUBOS

- **Tubos de repique** (aqueles onde são isolados os micro-organismos) devem ser devidamente tampados, porém as tampas não devem ficar muito apertadas (tubos rosqueados).
- **Tubos de ensaio e de hemólise** (não rosqueados) devem ser vedados com tampões de algodão. Após montados, devem ser embrulhados em papel madeira e devidamente identificados.

Os tampões devem penetrar 2 a 3 cm no interior dos tubos e permanecerem bem ajustados, pois permitem a entrada do ar e retêm os micro-organismos.



PIPETAS

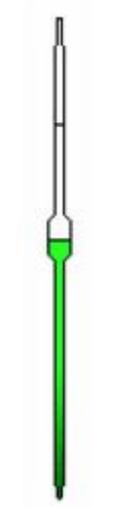
a montagem de pipetas pode ser feita a partir de um dos dois procedimentos:

- colocação em recipientes metálicos com a parte de aspirar para cima;
- enrolados individualmente em papel manteiga, com algodão inserido em sua extremidade

Algumas pipetas e
matérias,



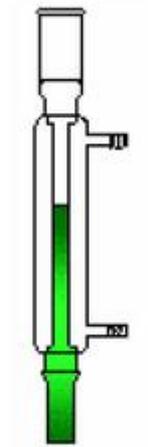
Pipeta
Graduada



Pipeta
volumétrica



Bureta



Condensador



Pipeta de Sahli / Thoma



Frasco de reagentes



Pisseta



Bico de Bunsen



Placa de Petri