

# 3ª Oficina Integrada das Redes de Carga Viral

Fontes de Contaminação Ambiental :  
Como minimizar os riscos

*Neiva Sellan Lopes Gonçalves*

*Grupo de Estudo das Hepatites – FCM/ UNCAMP*

# Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR desenvolvida em meados dos anos 80, revolucionou a Biologia Molecular :

- Mínimo de material genético
- Alta sensibilidade
- Alta especificidade
- Rapidez na liberação efetiva dos resultados
- Eficiência da Reação - PCR gera 10 milhões de cópia a partir de um alvo



Entretanto..... foi necessário redobrar o cuidado na manipulação das amostras amplificadas para evitar a contaminação da área do laboratório com amplicons.

# Cuidados na Manipulação de Ácidos Nucléicos



- Trabalhando com o DNA
- amostras frescas ou amostras colhidas e armazenadas em tubos específicos ou que tenham sido congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- Este procedimento minimiza a degradação do DNA por limitar a atividade de nucleases endógenas.
- Armazenamento do DNA - a melhor escolha é diluição em Tris-EDTA (TE), ou armazenar em soluções de etanol a  $0^{\circ}\text{C}$  ou a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Amplificações de DNA devem:

ser realizadas em ambientes limpos, livres de DNA. Isto garante que o único DNA presente na reação seja o adicionado pelo técnico.

DNAs contaminantes na PCR podem ter como origem:

- DNAs originários de outras amostras.
- DNAs originários de outros experimentos como, por exemplo, clones recombinantes, DNA plasmideal ou fragmentos de restrição purificados.
- DNAs originários de amplificações prévias da mesma sequência-alvo. Este tipo de contaminação costuma ser a mais problemática devido a abundância de DNA gerado após a reação de PCR e facilidade com que este DNA pode ser reamplificado.

Outras fontes de contaminação no laboratório :

- Bancadas de laboratório, equipamentos e pipetadores contaminados com preparações prévias de DNA.
- Termociclador

## Trabalhando com RNA

exige mais cuidados do que o DNA - a instabilidade química do RNA e a existência de RNases.

### - Fontes de contaminação com RNases no laboratório:

- Tampões e soluções: a autoclavagem das soluções não inativa as RNases.
- Sempre usar luvas ao trabalhar com RNA: após a colocação das luvas, não tocar em superfícies e equipamentos para evitar a reintrodução de RNases no material.
- Utilizar uma sala no laboratório somente para manipular RNA, com micropipetadores somente para trabalho com RNA. Os demais materiais (ponteiras, microtubos) devem ser livres de DNases e RNases.

- Bancadas: limpar com etanol 70%, ou hipoclorito de sódio 1%
- Instrumentos de metal: flambar em fogo antes do uso.
- Vidraria: aquecer em forno a 180°C durante várias horas ou lavar com uma solução contendo dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% em água destilada durante 1 hora. Secar e autoclavar todo o material (necessário para destruir resíduos de DEPC os quais podem reagir com outras proteínas ou com as adeninas do RNA).
- DEPC pode atacar os tubos de policarbonato (tubos de centrífuga) e microplacas de poliestireno, a descontaminação desses materiais pode ser feita com peróxido de hidrogênio a 3% (deixar de molho por 10 minutos). Resíduos de peróxido de hidrogênio são removidos pela lavagem dos materiais em água livre de RNases. Alternativamente, os materiais podem ser deixados de molho em NaOH 1N por uma hora a 37°C. Após, os materiais devem ser lavados com água livre de RNase.

# Evitando a Contaminação no laboratório





- Equipamentos de Proteção Individual – EPI
  - Óculos de segurança, protetor facial e máscaras descartáveis - usadas sempre que houver possibilidade de aerossóis.
  - Aventais longo de mangas compridas e punho retrátil, preferencialmente descartável – deve ser usados somente dentro da área do laboratório.
  - Luvas descartáveis – devem ser resistentes, de material sintético (vinil) ou látex para manipulação de materiais potencialmente infectantes. As luvas descartáveis, usadas para os procedimentos da técnica - PCR (Polimerase Chain Reaction) – devem ser isentas de talco.
  - Pipetas automáticas – devem estar calibradas e validadas.
  - Propés descartáveis
  - Equipamentos de Proteção Coletiva – EPC
    - Cabines de segurança biológica – classe II – devem ser posicionadas longe de portas, janelas e de equipamentos que de alguma forma promovam a movimentação do ar, empurrando ar não filtrado, diretamente para a superfície de trabalho, podendo assim contaminar o material que está sendo manipulado.
  - Calçados fechados e de material resistente.

## Evitar a formação de Aerossóis:

- Abrir os tubos contendo sangue, com a parte a ser aberta, envolvida em um pedaço de gaze ou papel absorvente.
- Usar uma gaze diferente para cada tubo , evitando assim a contaminação cruzada. Esse procedimento deve ser feito preferencialmente dentro de uma cabine de segurança biológica.
- Quando utilizar centrífugas e agitadores magnéticos, espere até a parada completa do equipamento para manipular o material.
- Verifique sempre que utilizar a centrífuga se ocorreu algum vazamento em seu interior durante o procedimento de centrifugação. Neste caso limpe-a com hipoclorito de sódio a 2%.

- Escolha dos controles positivo e negativo: a utilização de controles positivo e negativo é muito importante para testar a eficiência da reação e ausência de contaminantes que podem inibir a PCR.
- Importante não usar um controle positivo altamente concentrado (por exemplo, solução de DNA plasmideal contendo a sequência-alvo). Neste caso, diluir o controle positivo. Dependendo do sistema de detecção, 100 cópias da sequência-alvo são suficientes para serem utilizados como controle positivo da reação. Este cuidado reduz problemas de contaminação das amostras com o controle positivo.

Principal fonte de contaminação: DNA obtido como produto de amplificações prévias. Isto ocorre a partir de microaerossóis gerados durante a pipetagem e manipulação de amostras de PCR.

Importante ....observar o fluxo de pessoal no laboratório, sempre da área "limpa" em direção a área "suja", e não o contrário !

# Monitoramento da Contaminação



Controle negativo – Água ou amostra

- Detecta contaminantes presentes no reagente

Controle de tubo aberto

- Detecta contaminantes gerados por aerossóis

Teste do Esfregaço

- Detecta todos os amplicons de superfícies de trabalho e equipamento

## Falsos Negativos

- Protocolos de amplificação inapropriados
- Má preparação ou coleta do material
- Baixa recuperação pós extração
- Presença de inibidores
- Uso de reagentes inadequados
- Equipamentos de amplificação/detecção descalibrados
- Interpretação incorreta dos resultados

## Falsos Positivos

- Falta de padronização técnica
- Presença de amplicon previamente na amostra
- Presença de aerossóis
- Erros técnicos de preparo e manipulação – contaminação cruzada.



- CQI

## Controle Qualidade Interno

- Amostras conhecidas que são processadas conjuntamente com as amostras em todas as rotinas
- Evidenciam desvios de processos

# Redução do Risco de Contaminação

## Recomendações



- Preparo da amostra de DNA, reagentes da PCR, amplificação e análise de produtos amplificados em áreas separadas.
- O preparo da mistura de reagentes para a PCR deve ser feita em fluxo laminar equipada com luz UV.
- Troca de luvas (sem talco) para cada etapa de preparo da reação
- Uso de recipientes exclusivos para descarte de materiais da PCR.
- Uso de ponteiros com filtro ou de pressão positiva para evitar formação de aerossóis na pipetagem da amostra e reagentes.
- Uso de reagentes livres de DNase e RNase e nuclease, incluindo a água de alta qualidade.
- Sempre utilizar um controle livre de alvos , água ou amostra negativas (NTC) para checar eventuais contaminações.
- Trabalhar seguindo normas estritas de rastreabilidade do processo

## Amplicons

PCR pode ser contaminada por amplicons existentes na área laboratorial.

Método eficiente para prevenir a contaminação pelo carreamento é o uso de uracil DNA glycosylase\* (UDG)

-Uma parte de todo dTTP da reação de PCR é substituída por dUTP e assim, todo o produto de PCR gerado na reação contém dUTP. Antes de cada nova PCR, incubações curtas com UDG eliminam todos os amplicons carreados de PCR anteriores.

-Incorporação de dUTP não afeta o resultado da reação.

## Irradiação ultravioleta de superfícies

- A superfície a ser irradiada deve ser perpendicular à fonte de luz UV.
- Superfícies irregulares diluem a intensidade da luz.
- Objetos tri-dimensionais, como por exemplo, pipetadores não podem ser adequadamente descontaminados pela luz UV porque somente uma fração da superfície do pipetador entra em contato com a fonte de luz.
- DNAs muito pequenos (menores que 300 pares de base) podem ser resistentes a degradação pela luz UV.

Os materiais e equipamentos devem ser exclusivos de cada área.

- Equipamentos e materiais usados para o preparo dos reagentes não devem ser usados para preparo de amostras ou para pipetagem, processamento de ácido nucléico amplificado ou de outras fontes de ácido nucléico alvo.
- É muito importante que jamais sejam trocados materiais e equipamentos entre um ambiente e outro, e que aventais, luvas, canetas e etc... utilizados em um ambiente não sejam em hipótese alguma levados para outra área.

# Desinfecção do Laboratório



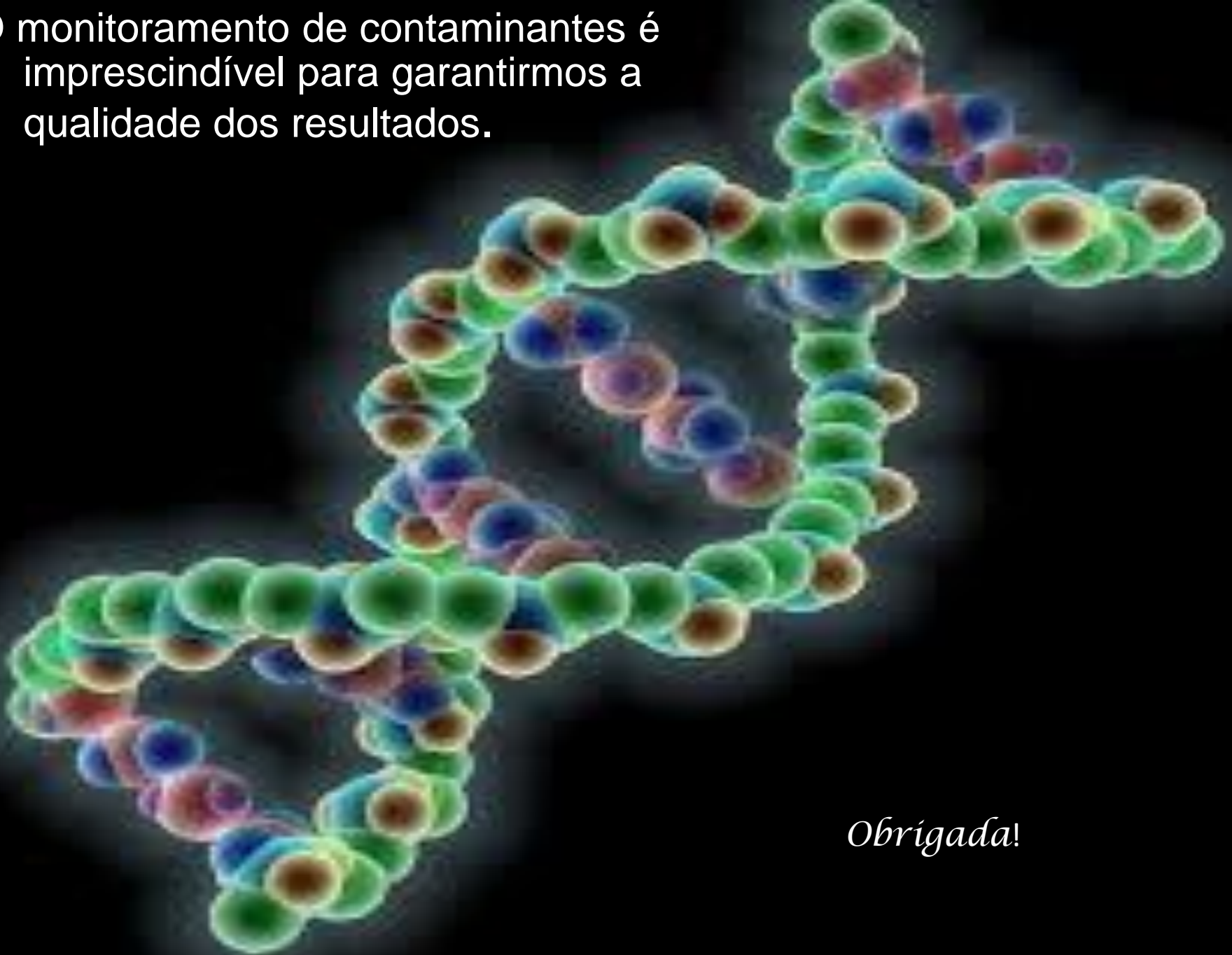
- O resíduo do do laboratório deve ser retirado 2 vezes ao dia.
- Semanalmente esvaziar o conteúdo do banho-maria, lavar seu interior e colocar água destilada. Checar a temperatura após esse procedimento.
- O piso deve ser limpo antes e no final da rotina de trabalho com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. Usar panos de chão distintos para a limpeza das salas.
- As bancadas devem ser descontaminadas com hipoclorito de sódio a 0,5% desde que não sejam de material metálico, nesse caso, proceder a limpeza com álcool 70% (p/p) antes e depois da rotina de trabalho.
  - Limpar todos os equipamentos – pipetas, centrífugas, agitadores, termoblocos, etc... – antes e depois de cada rotina, com álcool a 70% (p/p).
- Cabines de segurança com lâmpada ultravioleta, deve ficar ligada por 20 minutos após a passagem do álcool a 70% (p/p).
- Todos os procedimentos de limpeza devem ser feitos por pessoal qualificado com uso de EPI



## Descarte do Material Biológico

- Deixar o material NÃO descartável, imerso em uma solução de hipoclorito de sódio a 1 %, por um tempo mínimo de 24 horas, antes de ser lavado.
- Após esse tempo, drene o hipoclorito e descarte-o na rede de esgoto. Esse procedimento não oferece riscos para o meio ambiente, uma vez que depois de 24 horas o cloro já evaporou.
- Tubos contendo coágulos, sangue total ou soro puro devem ser autoclavados diretamente sem descontaminação prévia com hipoclorito, pois em presença de grande quantidade de matéria orgânica ele é ineficiente. Também podem ser descartados diretamente em recipientes rígidos com símbolo de infectante.
  
- Os resíduos, especialmente os perfuro - cortantes, devem ser descartados em recipientes de paredes rígidas , com tampa e identificados como infectantes.
  
- Colocar os resíduos sólidos em sacos próprios para autoclavação e após o procedimento (mínimo de 45 minutos em temperatura de 121°C), acondicionar em sacos plásticos de cor branca identificados com o símbolo de risco biológico.

O monitoramento de contaminantes é imprescindível para garantirmos a qualidade dos resultados.



*Obrigada!*