Manual de Biossegurança
Biotério

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES PATOGÊNICOS - FMRP

https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/fields/poster/pdf/37-_good_animal_care_and_good_science_go_hand_in_hand.pdf

Bruno Belmonte Martinelli Gomes
Profª. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Profª. Dra. Larissa D. Cunha
Ribeirão Preto | 2023

SUMÁRIO

Introdução *3*

OBJETIVO 3

O QUE SÃO OGMs? 3

Classes de Risco para OGMs 4

NOSSOS BIOTÉRIOS 5

PRÉ-REQUISITOS PARA UTILIZAÇÃO DO(S) BIOTÉRIO(S) 6

REQUERIMENTOS PARA UTILIZAÇÃO DO(S) BIOTÉRIO(S) 7

BIBLIOGRAFIA *9*

Introdução

OBJETIVO

Este Manual tem como objetivo principal orientar os usuários dos Biotérios do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – alunos, técnicos e pesquisadores – acerca das normas básicas de biossegurança e conduta na utilização destas instalações. Possuímos dois Biotérios, localizados no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (**Anexo 1**). Esses biotérios possuem a finalidade de manutenção e propagação de linhagens de camundongos geneticamente modificados, observação e intervenções experimentais dos mesmos.

Neste manual serão abordados temas como a definição de **Organismos Geneticamente Modificados** (OGMs), as diferentes classes de riscos envolvidos no manuseio destes organismos, bem como orientações para o manejo e descarte de resíduos oriundos da pesquisa com OGMs. Além disso, o usuário encontrará aqui os pré-requisitos necessários para o acesso e utilização dos biotérios presentes no Departamento e demais informações, baseadas na legislação vigente, sobre o uso correto e seguro de OGMs.

O QUE SÃO OGMs?

Os Biotérios do Departamento de Biologia Celular e Molecular constituem instalações certificadas como área de Biossegurança (NB-2) para atividades de pesquisa em regime de contenção com **Organismos Geneticamente Modificados** (OGMs) da classe de risco 2, como uma extensão do Certificado de Qualidade de Biossegurança (CQB) da FMRP-USP (**Anexo 2**).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os OGMs podem ser definidos como qualquer organismo (microrganismos, plantas, animais) cujo material genético (DNA e/ou RNA) tenha sido modificado de alguma maneira que não ocorreria naturalmente, seja por cruzamentos ou recombinações naturais. Ou seja, qualquer organismo modificado por técnicas de engenharia genética. No Brasil, as atividades e produtos derivados de OGMs são regulamentados pela **Lei Federal de Biossegurança n° 11.105, de 24 de março de 2005**, implementada por normas técnicas definidas e implementadas em âmbito nacional pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

A **Comissão Interna de Biossegurança** (CIBIO) é o órgão responsável pelo monitoramento e vigilância das atividades com OGM e seus derivados, previstas no art. 1º da Lei 11.105, de 2005, e para fazer cumprir as normas de biossegurança no uso destes organismos.

Quer trabalhar com OGMs? A CIBIO é o órgão a ser contatado para orientações referentes aos cuidados necessários para o uso de OGMs, principalmente aqueles do Grupo de Risco 2. A CIBIO da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São

Paulo é coordenada pelo Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi (e-mail *luiztosi@fmrp.usp.br*).

Abaixo seguem informações importantes caso o projeto do usuário preveja criação ou intervenções experimentais envolvendo organismos **Classe de Risco 2 (CR-2), OGMs ou não.**

Classes de Risco para OGMs

Segundo o preconizado pela CTNBio,a avaliação de risco deve ser uma abordagem ampla e abrangente, capaz de cobrir não somente as diversas formas de **apresentação** do risco, mas também a **extensão** do mesmo,além das medidas necessárias para evitá-lo.

Dentre as características consideradas importantes para avaliar os riscos, podemos destacar: **virulência, modo de transmissão, estabilidade** do patógeno no ambiente, **dose infectante** e **eliminação** do agente. Com base nestes e em outros fatores, os agentes potencialmente patogênicos são divididos em quatro **Classes de Risco** (CRs):

- **Classe de risco 1 (CR-1, baixo risco individual e para a comunidade):** inclui osagentes biológicos conhecidos por não causarem doenças no homem ou nosanimais adultos sadios. Exemplos: *Lactobacillus* sp. e *Bacillus subtilis*.
- **Classe de risco 2 (CR-2, 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: *Leishmania brasiliensis*, *Legionella* spp. e *Paracoccidioides brasiliensis*.
- **Classe de risco 3 (CR-3, alto risco individual e moderado risco para a comunidade):** inclui os agentes biológicos que possuem capacidade de transmissão por via respiratória e que causam patologias humanas ou animais, potencialmente letais, para as quais existem usualmente medidas de tratamento e/ou de prevenção. Representam risco se disseminados na comunidade e no meio ambiente, podendo se propagar de pessoa a pessoa. Exemplos: *Bacillus anthracis* e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).
- **Classe de risco 4 (CR-4, alto risco individual e para a comunidade):** inclui os agentes biológicos com grande poder de transmissibilidade por via respiratória ou de transmissão desconhecida. Até o momento não há nenhuma medida profilática ou terapêutica eficaz contra infecções ocasionadas por estes. Causam doenças humanas e animais de alta gravidade, com alta capacidade de disseminação na comunidade e no meio ambiente. Esta classe inclui principalmente os vírus. Exemplos: Vírus Ebola e Vírus Lassa.

Os OGMs são classificados em **dois Grupos**, de acordo com o potencial patogênico

do **organismo doador/receptor**, da **modificação gerada** e do **organismo modificado resultante**. O **Grupo 1** abrange todos OGMs **não-patogênicos** (CR-1). Já o **Grupo 2** é composto por OGMs que se enquadrem nas **Classes de Risco 2, 3** ou **4**, sendo considerados, em diversos níveis, patogênicos e que ofereçam riscos individuais e/ou ambientais. No **Anexo 3** encontra-se um conjunto de normas publicadas pelo Ministério da Saúde (2010) sobre a classificação de Risco de diversos Agentes Biológicos.

IMPORTANTE: Em termos práticos, um camundongo transgênico do **Grupo 1**, apesar de não ser patogênico, ao ser infectado por um patógeno (OGM ou não) da **Classe de Risco 2(CR-2)** torna-se **automaticamente** um OGM do **Grupo 2** e deve, portanto, ser tratado como tal.

NOSSOS BIOTÉRIOS

O **Biotério principal** é composto pelas salas de **Criação, Experimentação** e **Cirurgia.** A **Criação** é destinada à manutenção e propagação das linhagens de animais. É equipada com fluxo laminar para manuseio de gaiolas e camundongos GM, e racks com controle de fluxo de ar para acondicionamento das gaiolas. Na sala de **Criação** encontram-se os estoques e casais.

A sala de **Experimentação** abriga os grupos experimentais, ou seja, animais que estejam sob observação ou que sofram intervenções. Ela é equipada com diversas racks com controle de fluxo de ar para acondicionamento dos animais. Tais **intervenções experimentais** (aplicação de drogas, inoculação de microrganismos, cirurgias, etc) devem ser realizadas na sala de **Cirurgia**, que é equipada com fluxo laminar, aparelho de anestesia inalatória e câmara de eutanásia por CO_2.

O biotério ainda possui antessala com estrutura necessária para a limpeza das gaiolas, que precede sua esterilização periódica por autoclave. Além disso, há uma **divisão física** entre **áreas sujas** e **limpas**. Mais detalhes sobre a divisão das áreas e o acesso a elas serão abordados na seção Paramentação.

IMPORTANTE: O **fluxo de animais** entre as salas de Criação e Experimentação é **unidirecional**. Ou seja, uma vez que o animal é retirado da sala de Criação para a Experimentação, o mesmo não pode, em hipótese alguma, retornar. É um caminho sem volta, então muita atenção, ok?

Nosso Departamento ainda possui um **Biotério *SPF*** (*Specific-pathogen-free*), no qual o acondicionamento de animais é limitado e exclusivo para aqueles com resultado negativo para patógenos em teste sanitário (**Anexo 4**). Um teste com resultado positivo pode ser visto

no **Anexo 5.**

Este biotério é composto por 3 ambientes: uma **antessala** (suja), que contém a estrutura necessária para limpeza das gaiolas e uma autoclave de passagem para esterilização das mesmas; uma sala **intermediária** (limpa), onde são retirados os itens autoclavados; e uma sala de **Animais** (limpa), onde os animais são acondicionados em racks com controle de fluxo de ar, e que possui, também, um fluxo laminar e aparelho para anestesia inalatória.

As plantas dos biotérios estão disponíveis no **Anexo 1**.

IMPORTANTE: A transferência de animais do biotério principal ao SPF somente poderá ocorrer mediante solicitação e processo de rederivação no Biotério Central da USP-RP. Neste processo, é garantido que os animais transferidos ao biotério SPF sejam livres de patógenos. A admissão de novos animais, provenientes de outros biotérios, precisa ser acompanhada de teste sanitário atualizado (dos últimos 15 dias) e negativo.

IMPORTANTE: Por se tratar de um biotério SPF, e a fim de se manter este *status*, o acesso ao Biotério é **limitado** e **controlado**. É terminantemente **vetada** a entrada de qualquer usuário ao biotério SPF nas **48 horas** posteriores à sua entrada no biotério principal ou em qualquer biotério não-SPF.

PRÉ-REQUISITOS PARA UTILIZAÇÃO DO(S) BIOTÉRIO(S)

1) Realizar o curso de capacitação no uso de animais

O curso de capacitação em princípios éticos e manejo de animais em pesquisa atende as à RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA/MCTI Nº 49, DE 7 DE MAIO DE 2021 que dispõe sobre a obrigatoriedade de capacitação (ética e prática) do pessoal envolvido em atividades de ensino e pesquisa científica que utilizam animais. A realização do curso precede a obtenção de acesso ao biotério para criação e realização de procedimentos. O curso e demais instruções para sua realização estão disponíveis no site da CEUA-FMRP (https://ceua.fmrp.usp.br/capacitacao-uso-animais/).

O certificado de aprovação no curso deverá ser encaminhado à Profª. Larissa Dias da Cunha, no e-mail: larissacunha@usp.br.

ATENÇÃO: O treinamento e certificação das habilidades práticas específicas para cada laboratório são de responsabilidade do **próprio laboratório**.

2) Obter aprovação para o projeto junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Todos os projetos em andamento nos biotérios seguem as normas preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMRP, de forma a garantir o respeito, a dignidade e boas práticas recomendadas internacionalmente no uso de animais experimentais. Os protocolos de cada usuário devem ser submetidos à CEUA com dois meses de antecedência à data de início, e só podem ser iniciados após aprovação por este órgão.

Para mais informações sobre a CEUA-FMRP, acesse: http://ceua.fmrp.usp.br/

REQUERIMENTOS PARA UTILIZAÇÃO DO(S) BIOTÉRIO(S)

A fim de se manter o controle e organização dos usuários do biotério, bem como garantir a segurança dos usuários e dos animais ali presentes, é necessário que se cumpram os requisitos listados a seguir:

1) Respeitar as normas de Paramentação

O uso de paramentação do usuário com os seguintes itens de equipamento de proteção individual (EPI) é **obrigatório** para acesso as áreas limpas dos biotérios. Essa norma é necessária para se manter níveis aceitáveis de limpeza e evitar tanto a contaminação dos usuários quanto dos animais.

- **Touca de proteção descartável, máscara de proteção descartável, avental descartável** e **sapatilhas pró-pé descartáveis**.

  No **biotério principal**, é disponibilizada uma rack na **área de troca** para armazenamento dos kits de paramentação dos usuários, desde que identificados adequadamente. É recomendado o descarte dos EPIs a cada uso, embora seja permitida a reutilização do mesmo, desde que para entrada em apenas uma sala e que o kit permaneça guardado na área de troca. Já no biotério SPF, toda vestimenta deve ser descartada apósutilização única.

- O usuário deverá se vestir na **área de troca**, delimitada como **suja**, com **exceção dos pró-pés**, que deverão ser calçados, alternadamente, à medida em que o usuário entra na área **limpa**. Ou seja, não se pode pisar sem pró-pés na área limpa.

- Por se tratarem de ambientes diferentes, os usuários do **biotério principal** devem possuir um kit de vestimenta para a sala de **criação** e outro para as salas de **experimentação** e **cirurgia**. É **expressamente proibido** o tráfego entre as salas de criação e experimentação/cirurgia portando a mesma

vestimenta. Conforme o fluxo de animais, o fluxo da vestimenta também é **unidirecional**.

- A retirada da paramentação deve ser feita na **área de troca**, com atenção à retirada dos pró-pés, que deve ser feita alternadamente à medida em que o usuário sai da área limpa. Ou seja, não se pode pisar com pró-pés na área de troca.

- O descarte de pró-pés e demais itens de paramentação deve ser feito no lixo com **saco branco**, posicionado na área de troca.

2) Conhecer e aplicar os Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) dos Biotérios

Na página dos Biotérios encontram-se os arquivos referentes aos Procedimentos Operacionais Padrões (POPs) pertinentes a rotina de limpeza do biotério, rotina de limpeza e manutenção de gaiolas, identificação apropriada de gaiolas e descarte adequado de resíduos. Esses procedimentos devem ser de conhecimento geral dos usuários.

IMPORTANTE: Cada Pesquisador Responsável deverá fornecer os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) específicos referentes às atividades executadas por usuários provenientes de seu laboratório no(s) biotério(s). Todas as atividades executadas devem possuir um POP individual, e o conjunto deverá ser encaminhado à Profª Dra. Larissa D. Cunha.

3) Conhecer e aplicar as normas de manejo de resíduos específicas

O manejo de resíduos segue o preconizado por normas legais, como a **RDC 306/04** (ANVISA) e **358/05** (CONAMA), além da **Lei Federal de Biossegurança n° 11.105, de 24 de março de 2005.**

O correto manejo de resíduos é feito de acordo com as Classes de Risco dos diversos OGMs e subprodutos de experimentações com os mesmos. Deve-se seguir critérios rigorosos para segregação, acondicionamento, e transporte destes resíduos. É de suma importância a **identificação** dos resíduos, a fim de se garantir a segurança de quem os manipula.

Manejo de resíduos gerados por OGMs de Classe 1

De forma sucinta, resíduos gerados a partir de OGMs do **Grupo 1** seguem as normas de descarte seguro em qualquer laboratório. Ponteiras, pipetas graduadas, restos de ração e meios de cultura devem ser acondicionados em recipientes plásticos; materiais perfurocortantes devem ser descartados em recipiente próprio (Caixa de perfurocortantes); e todos os demais resíduos (desde algodão e placas até carcaças de animais) devem ser descartados em saco de lixo branco.

ATENÇÃO: Recipientes que não sejam descartáveis devem ser descontaminados por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 30 minutos, antes da lavagem.

Manejo de resíduos gerados por OGMs de Classe 2

Atenção especial deve ser dada aos resíduos provenientes de animais do **Grupo 2**. Todos resíduos devem ser acondicionados em sacos ou recipientes rígidos autoclaváveis, e restos líquidos devem ser descartados imediatamente em recipientes rígidos com vedação, que posteriormente serão alocados em sacos autoclaváveis. Restos mortais de animais deste grupo (carcaças, membros e órgãos), bem como a maravalha de suas gaiolas, devem ser **esterilizados** em autoclave presente no próprio local de geração do resíduo (biotério), ou em uma área de **Nível Biológico 2 (NB-2)**. Somente após esterilização adequada, os resíduos podem ser descartados em sacos de lixo branco.

ATENÇÃO: Todo resíduo de Grupo 2 deve ser **IDENTIFICADO** de maneira clara pelo experimentador (adesivo de Risco Biológico). Além disso, o funcionário responsável pela esterilização (bioterista ou técnico) deve ser previamente notificado sobre quais gaiolas contêm animais do Grupo 2, para que sejam tratadas da maneira correta.

IMPORTANTE: Ainda sobre OGMs nível 2, caso materiais provenientes de animais deste grupo (carcaças, peças anatômicas, órgãos etc) precisem ser levados ao laboratório, é **necessário** que tanto o laboratório quanto o professor responsável sejam certificados pela CIBIO para o manuseio seguro de OGMs nível 2.

BIBLIOGRAFIA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ.* Rio de Janeiro, 2005. 221 p.

CIBIO – FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO. *Orientações para Manuseio, Processamento e Descarte de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs).* Ribeirão Preto, 2015. 25 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Classificação de Risco dos Agentes Biológicos.* Brasília: Editora MS, 2010. 44 p.

Lei n° 11.105, de 24 de março de 2005 – Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm

Resolução – RDC n° 306, de 7 de dezembro de 2004 – Disponível em:
http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/rdc-306-de-7-de-dezembro-de-2004

Resolução n° 358/05, de 29 de abril de 2005 – Disponível em:
http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35805.pdf