

Universidade de São Paulo - Instituto de Química



# Manual de Biossegurança para pesquisa com Vetores Lentivirais



2017



**Manual elaborado pelo:**

Prof. Dr. Alexandre Bruni Cardoso

Instituto de Química da USP

Manual baseado em modelo disponibilizado pela Oregon Health and Science University (OHSU) seguindo as recomendações do NIH e da ACOEM- USA

Comissão Interna de Biossegurança (**CIBio**) do Instituto de Química da USP

Contato: [cibio@iq.usp.br](mailto:cibio@iq.usp.br)

**Manual de Biossegurança para pesquisa com Vetores Lentivirais**

**aprovado na Ata nº 27 em reunião da CIBio do IQ-USP realizada em 22 de junho de 2017**



## ÍNDICE

Treinamento _____	4
Introdução- riscos de exposição aos vetores lentivirais _____	4
Características básicas dos sistemas de vetores lentivirais usados no laboratório _____	5
Avaliação de risco _____	7
Cuidados de Biossegurança e Procedimentos _____	9
Recomendações aos profissionais de saúde que venha atender a pessoa afetada pela exposição aos vetores lentivirais _____	14
Plano de resposta em caso de incidentes de exposição aos vetores lentivirais _____	15
Protocolo para a produção de partículas lentivirais _____	17
Referências. _____	18
Anexo: Cartões listando as etapas da resposta em caso de derrame _____	19



## **Treinamento**

**Treinamento:** Técnicos e alunos serão autorizados a realizar trabalho com vetores lentivirais somente após um *treinamento específico*. O treinamento será ministrado pelo pesquisador principal. O técnico e o aluno deverão demonstrar habilidades teóricas e práticas e cuidado no trabalho com material microbiológico e cultura de células

## **Introdução**

### ***Riscos de exposição aos vetores lentivirais***

*Os riscos descritos aqui foram considerados para a avaliação de risco, procedimentos de trabalho e planos de contenção em caso de derrame e acidentes. Além disso, consideramos as características dos sistemas de vetores lentivirais e a natureza do trabalho empregados no Laboratório de Sinalização da Matriz Extracelular- IQUSP. Estas informações de risco são oriundas documento Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors do National Institute of Health (NIH- Estados Unidos) e do documento Risks Associated with Lentiviral Vector Exposures and Prevention Strategies do artigo recomendado pelo Center of Diseases Control (CDC- Estados Unidos) que foi produzido pelo American College of Occupational and Environmental Medicine (ACOEM).*

Os maiores riscos a serem considerados na pesquisa que envolve vetores lentivirais baseados em HIV-1 estão no potencial de geração de lentivírus capazes de se replicarem (replication-competent lentivirus; RCL) e no potencial oncogênico via integração genômica do vetor. Esses riscos podem ser reduzidos pelas características de biossegurança do sistema de vetor ou maximizados se o gene inserido no vetor codificar um oncogene clássico.

A rotas mais críticas de exposição ao vírus são via perfurocortantes (como seringas e agulhas), absorção por arranhões ou outras feridas na pele, contato direto com mucosas do olho, nariz e boca. Uma outra via seria a inalação via aerossol formado durante procedimentos que utilizam centrífugas e *vortex*. O processo de pipetagem deve ser também cuidadoso para evitar derrames e formação de aerossol. Indivíduos portadores de doenças que comprometem o sistema imunitário não devem trabalhar com lentivírus. Existe a possibilidade de haver um risco aumentado para indivíduos que são HIV positivo, já que o vírus selvagem pode recombinar com o vetor lentiviral. Estes indivíduos são encorajados a revelarem esta informação ao pesquisador principal do laboratório.

*O potencial para a geração de RCL:* depende de diversos fatores, sendo os mais importantes: i) O número de eventos de recombinação necessários para a reconstrução de um genoma viral com capacidade replicativa; ii) o número de genes essenciais do HIV que foram deletados no vetor/sistema de empacotamento. Neste contexto, os sistemas de vetores lentivirais de última geração, como os utilizados no Laboratório de Sinalização da Matriz Extracelular, oferecem um nível de segurança biológica para os pesquisadores e público em geral que as versões mais antigas dos vetores. Os sistemas de última geração: a) utilizam uma proteína envelope heteróloga (como o VSV-G) em vez da proteína nativa do envelope do HIV. (Uma nota importante é que algumas proteínas de envelope viral, como o VSV-G que fazem parte dos sistemas que usamos no laboratório, podem aumentar o número de células hospedeiras e tropismo dos vetores lentivirais. Este fator é levado em consideração na nossa avaliação de risco). b) apresentam as funções de vetor e empacotamento em 4 ou mais plasmídeos, o que reduz drasticamente o risco de



geração de RCL. Os sistemas utilizados no laboratório (Lenti-X Tet-One (Clontech, cat#631847 e pCTH-EF1-MCS-T2Apuro (System Biosciences, cat#CD500) contém 4 e 5 plasmídeos respectivamente. c) apresentam características adicionais de segurança como a deleção do gene Tat que é essencial para a replicação do HIV-1 selvagem. Em contraste, as versões mais antigas com até 2 plasmídeos podem ter um alto potencial de geração.

Teste para RCL: O National Gene Vector Laboratory (NGVL) nos Estados Unidos produziu mais de 60 litros de vetores baseados em HIV-1 e monitorou os sobrenadantes e células de diferentes sistemas de vetores, usando diferentes ensaios e não detectou a geração de RCL (K. Cornetta, comunicação pessoal para o NIH; informação contida no documento *Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors*). Isso sugere que a probabilidade para a geração de RCL a partir de vetores lentivirais é baixíssima. A probabilidade pode não ser zero, assim há a necessidade de investigação continuada nos experimentos com vetores lentivirais. O Food and Drug Administration (FDA) exige que estoque de vetores lentivirais utilizados em clinical trials sejam testados para geração de RCL. Laboratórios de pesquisa, como o nosso, frequentemente utilizam somente pequenos volumes de meio contendo vetores lentivirais em baixa concentração. Nos Estados Unidos, estes laboratórios não são obrigados a caracterizar os estoques de vetores, mas o teste é encorajado. Entretanto, teste para RCL requer expertise em ensaios apropriados e esta expertise não é encontrada facilmente em laboratório que não trabalham regularmente com lentivírus infecciosos. Nestes laboratórios, o uso de um controle positivo pode ser mais perigoso aos pesquisadores que o próprio material teste. Portanto, dada a natureza dos experimentos realizados no nosso laboratório e como os vetores lentivirais que utilizamos são de última geração considerados extremamente seguros, nós optamos por não fazer o teste para RCL.

O Potencial de oncogênese dos vetores lentivirais depende de dois fatores principais: i) probabilidade de mutagênese insercional e ii) oncogênese direta devido a natureza oncogênica do transgene (ex: genes RAS e cMYC). *Mutagênese insercional*- dependendo do local no genoma de integração, o vetor lentiviral pode danificar a regulação do desenvolvimento e proliferação das células, afetando a função das células podendo levar a oncogênese. *Oncogênese direta pelo transgene*- se os transgenes utilizados são genes com provável potencial oncogênico ou de supressão de tumores, o que pode induzir a transformação oncogênica das células afetadas. Na nossa pesquisa, utilizamos genes selvagens e mutantes (com ganho ou perda de função) da via Hippo-YAP. A proteína produto do gene YAP atua na ativação de genes relacionadas a proliferação, sobrevivência e diferenciação de células. YAP, apesar de não ser considerado um *oncogene* clássico (como RAS e cMYC), já foi associada em diversos trabalhos a tumorigênese em cultura de células e modelos animais. Hippo é um conjunto de kinases cujo atividade inibe YAP. Portanto as kinases Hippo são candidatas em potencial a *supressores de tumor* (Moroishi et al 2015).

### ***Características básicas dos sistemas de vetores lentivirais usados no laboratório***

As especificações completas dos sistemas podem ser acessadas nos sites: *Systems Biosciences* ([https://www.systembio.com/downloads/Manual\\_pCDH\\_Vector\\_v5.pdf](https://www.systembio.com/downloads/Manual_pCDH_Vector_v5.pdf)) e *Clontech* ([http://www.clontech.com/BR/Products/Viral\\_Transduction/Lentiviral\\_Vector\\_Systems/Tet-Inducible?sitex=10028:22372:US](http://www.clontech.com/BR/Products/Viral_Transduction/Lentiviral_Vector_Systems/Tet-Inducible?sitex=10028:22372:US)).

#### **1. Lenti-X Tet-One (Clontech, cat#631847)- sistema Vetor lentiviral não-replicante de expressão induzível.**

- O vetor de expressão contém os seguintes elementos: Sítio de clonagem (MCS), elemento WPRE, sinal de poliadenilação SV40, sinal de empacotamento 5'LTR e 3'LTR, Tet-On 3G



dirigido pelo promotor hPGK, Promotor TRE3Gorigem de replicação SV40, promotor EF1, sequência T2A, origem de replicação, AmpR (gene resistência à ampicilina) e PuroR (gene de resistência à puromicina) dirigido pelo promotor SV40.

- As funções de vetor de expressão e empacotamento estão separadas em 5 plasmídeos. Quatro plasmídeos de empacotamento que contém os genes Pol, Tat, Rev, Gag e VSV-G e 1 vetor de expressão Tet-one.
- O sistema é considerado de alto nível de segurança biológica. Os genes que as expressam as proteínas de empacotamento das partículas lentivirais são separados em 4 diferentes plasmídeos, o que previne a inclusão coletiva dessas sequências codificadoras nas partículas durante o processo de empacotamento. NÃO há homologia de sequências entre os vetores de empacotamento e o vetor de expressão o que previne eventos de recombinação homóloga. Além disso, este sistema, de genes em vetores separados é uma estratégia altamente eficiente para a prevenção de lentivírus com capacidade replicativa. Portanto, os vírus não podem replica de forma autônoma nas células-alvo. As partículas de vetores lentivirais carregarão somente uma cópia da construção a ser expressa.

## 2. Vetor lentiviral não-replicante pCTH-EF1-MCS-T2Apuro (System Biosciences, cat#CD500).

- O vetor de expressão contém os seguintes elementos: Sítio de clonagem (MCS), elemento WPRE, sinal de poliadenilação SV40, promotor híbrido RSV/5LTR, origem de replicação SV40, promotor EF1, sequência T2A, origem de replicação pUC, AmpR (gene resistência à ampicilina).
- O vetor contém características que maximizam a sua segurança:
- Uma deleção no enhancer da região U3 do 3'ΔLTR que assegura auto-inativação da construção lentiviral após a transdução e integração no DNA genômico das células-alvo
- O promotor RSV upstream de 5'LTR (formando o promotor híbrido RSV/5'LTR) no vetor permite uma produção de RNA viral independente de Tat, o que permite um número reduzido de genes provenientes no HIV
- O número de genes lentivirais necessários para o empacotamento é reduzido a 3 (gag, pol, rev), e as proteínas correspondentes são expressas em 3 plasmídeos separados que não contém sinais de empacotamento e não possuem homologia com qualquer vetor de expressão lentiviral, com o vetor de expressão pVSV-G, ou qualquer outro vetor, prevenindo assim a geração de vírus recombinantes com capacidade de replicação



### *Avaliação de risco*

*Tabela com parâmetros considerados para a avaliação de risco de segurança biológica. Segundo recomendação do NIH (documento Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors) e do American College of Occupational and Environmental Medicine (documento Risks Associated with Lentiviral Vector Exposures and Prevention Strategies; Schlimgen et al., 2016)*

	<b>Risco Alto</b>	<b>Risco Baixo</b>
<b>Número de plasmídeos utilizados para a geração de partículas virais</b>	2 ou menos plasmídeos	3 à 4 plasmídeos
<b>Transgene</b>	Oncogênico, apoptótico, imunomodulador ou tóxico em geral	Não-oncogênico, não-apoptótico, não-imunomodulador ou não-tóxico em geral
<b>Propagação do vetor</b>	Larga escala (>100 mL)	Baixa escala (<100 mL)
<b>Concentração</b>	>1x10 <sup>9</sup> unidades infecciosas/mL	<1x10 <sup>9</sup> unidades infecciosas/mL
<b>Porcentagem do genome deletado ou substituído</b>	<2/3	>2/3
<b>Tropismo de hospedeiro</b>	Tropismo para células não humanas	Tropismo para diversas células humanas (sistema contém VSV-g)

De acordo com o documento Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors do *Recombinant DNA Advisory Committee (RAC)* do National Institute of Health (NIH) dos Estados Unidos: Salas de cultura NB2 ou NB2+ (enhanced BL2) são, no geral, apropriadas para o trabalho com vetores lentivirais de última geração (o que é o caso dos sistema **pCTH-EF1-MCS-T2Apuro** e **Lenti-X Tet-One (Clontech, cat#631847** que utilizamos no nosso laboratório) que apresenta múltiplas característica de biossegurança e que tem as funções para o empacotamento das partículas lentivirais separadas em 4 ou mais plasmídeos. NB2+ inclui atenção especial a perfurocortantes e uso de EPIs que reduzem o risco de exposição do vetor a mucosas (Nós NÃO utilizaremos perfurocortantes e material de vidro em nenhuma uma etapa do trabalho com os vetores lentivirais; utilizaremos substitutos plásticos).

É importante ressaltar que estes níveis de contenção, NB2 e NB2+ são considerados apropriados mesmo para a produção de grandes volumes de vetores baseados em HIV-1 (>10 L). No nosso laboratório, não pretendemos executar experimentos com mais de 100 mL de meio contendo partículas lentivirais. É importante mencionar que não há casos documentados de transmissão de HIV pelo ar em clínicas que



trabalhar com amostras de pacientes. Entretanto, há casos reportados de transmissão por gotículas de aerossol (Eberle et al., 2000). Nós tomaremos todas as precauções necessárias (como descrito no tópico Cuidados de Biossegurança e Procedimentos) para evitar a formação de aerossol e tomaremos medidas apropriadas de segurança biológica caso ocorra, ou há suspeita de, geração de aerossol e também exposição aos pesquisadores.

De acordo com tabela acima e baseado nas características dos sistemas de vetores lentivirais e a natureza da pesquisa do Laboratório de Sinalização da Matriz Extracelular, em somente 2 quesitos, **transgene** e **tropismo de hospedeiro**, a pesquisa no laboratório probabilidade de risco alta. Portanto, o nível de biossegurança considerado adequado para o trabalho com vetores lentivirais no nosso laboratório é NB2+ (Enhanced BL2). Ou seja, sala de cultura onde serão executados a produção de partículas lentivirais e transfecção de células têm características estruturais de um laboratório NB2, mas durante o trabalho com os vetores, serão utilizados procedimentos de segurança adicionais.

Abaixo estão em mais detalhes as características do trabalho no laboratório com vetores lentivirais levadas em consideração para a avaliação de risco:

- Os sistemas de vetores lentivirais utilizados no laboratório contém 4 e 5 plasmídeos (**risco baixo**)
- O volume de meio de cultura contendo vírus será menor que 100 mL. No geral, entre 30-90 mL serão produzidos de cada vez (**risco baixo**).
- Utilizaremos concentração de  $<1 \times 10^9$  unidades infecciosas/mL. Não utilizaremos nenhum método para concentrar as partículas lentivirais (**risco baixo**).
- Os sistemas de vetores lentivirais que utilizamos tem mais de 2/3 do genoma deletado (**risco baixo**).
- Apesar de não pesquisarmos oncogenes clássicos, nós estudamos genes membros da via Hippo-YAP que tem sido associado com progressão do câncer em modelos de cultura e em animais. Há, portanto, a probabilidade de perturbações na regulação da via Hippo-YAP terem relevância oncogênica (**risco alto**).
- Os sistemas de vetores lentivirais que utilizamos contém o gene para a expressão da proteína heterólogo do envelope VSV-g que dá as partículas lentivirais tropismo à diversas células humanas (**risco alto**).

Os procedimentos especiais, além dos de rotina para uma sala NB2, incluem uso de i) Equipamento de Proteção Individual (EPI) (luvas (duplas) e aventais descartáveis, máscara cirúrgica, óculos de segurança), ii) centrífuga moderna com sistema de segurança em caso de falha e rotor com tampa anti-aerossol (as partículas lentivirais NÃO serão concentradas com ultracentrifugação ou qualquer outro método), iii) a NÃO utilização de perfurocortantes e vidrarias em qualquer etapa do trabalho com os vetores lentivirais, iv) kit e procedimentos padrão para contenção em caso de derrame, v) somente membros do laboratório treinados e capacitados poderão realizar trabalho com os vetores lentivirais, vi) plano de resposta em caso de incidente onde ocorra contato do pesquisador com os vetores lentivirais. Os procedimentos para o trabalho com as partículas lentivirais estão detalhados abaixo.



## *Cuidados de Biossegurança e Procedimentos*

### **1. Inativação e descontaminação de superfícies**

Alguns reagentes podem ser utilizados para a descontaminação de partículas lentivirais como \*hipoclorito de sódio 10% e os desinfetantes comerciais Amphyl 5 Wescodyne 0.5% (iodophor). Este manual foi escrito para o uso de hipoclorito de sódio, mas outros desinfetantes podem ser utilizados como alternativa, se estes forem efetivos para descontaminar lentivírus.

#### **\*Nota importante sobre o hipoclorito de sódio**

Hipoclorito de sódio é efetivo na descontaminação, barato, mas é volátil e corrosivo. Papel toalha embebido em hipoclorito não deve ser autoclavado, pois o processo de autoclavagem libera o cloro que pode com o tempo corroer a autoclave. As soluções hipoclorito de sódio 10% devem ser preparadas frescas antes do experimento. Se a solução hipoclorito de sódio 10% for utilizada para descontaminar um derrame numa cabine de biossegurança, após o derrame ser absorvido com papel toalha e desinfetado com hipoclorito de sódio 10%, a superfície da cabine deve ser limpa com etanol 70% para a remoção de qualquer resíduo de hipoclorito de sódio.

### **2. Contenção física**

Segundo recomendações do NIH no geral o trabalho com vetores lentivirais deve ser realizado em laboratórios com nível de biossegurança 2 (NB2). NB2 inclui, mas não é limitado, uma sala apropriada para o cultivo de células equipada com uma cabine de biossegurança Classe II e uma incubadora para o cultivo de células. Na nossa sala NB2, nós disponibilizamos uma cabine de biossegurança Classe II e uma incubadora inteiramente dedicadas ao trabalho com vetores lentivirais, durante os procedimentos para a produção das partículas lentivirais e para a infecção das células hospedeiras. Durante o trabalho com as partículas lentivirais, um sinal de alerta será postado na porta da sala alertando que há experimento com vetores lentivirais em andamento. A linhas de aspiração à vácuo serão equipadas com um filtro HEPA e um recipiente reservatório contendo hipoclorito de sódio 10%. No nosso laboratório, nós NÃO concentraremos as partículas lentivirais (portanto, não será utilizada ultracentrifugação ou soluções para a concentração das partículas). O processo de concentração de vírus, obviamente, aumenta a quantidade de partículas virais por volume e também aumenta o risco de formação de aerossóis. No trabalho com as partículas, na etapa de centrifugação para eliminação dos debris de células, serão utilizados tubos tipo *Falcon* 50 mL hermeticamente que suportam a centrifugação com força média (conforme detalhado nos procedimentos abaixo, os tubos somente serão abertos dentro da cabine de segurança). A centrífuga (Eppendorf 5810R) utilizada terá rotores removíveis e tampa (#F34-6-38) que previne a liberação de aerossol. A centrífuga está instalada dentro da sala NB2.

### **3. Equipamentos de proteção individual (EPIs)**

Os EPIs obrigatórios durante o trabalho com vetores lentivirais: luvas (duplas) e aventais descartáveis, máscara cirúrgica, óculos de segurança. Atenção especial deve ser tomada para que não tenha partes dos pulsos expostas. É recomendado colocar os punhos do avental por dentro das luvas. As luvas potencialmente contaminadas devem ser removidas e trocadas por luvas novas antes de tocar qualquer coisa fora da cabine de biossegurança, tais como refrigeradores, centrífugas e incubadoras.



#### 4. **Kit para contenção em caso de derrame/vazamento**

O laboratório deve ter um kit de contenção de derrame. O kit contém: uma lista de fácil leitura de passos a serem seguidos em caso de derrame de lentivírus (procedimentos operacionais padrão; POP. Confira anexo), luvas, máscara, óculos, avental, papel toalha, par de alpargatas, hipoclorito de sódio 10%, um recipiente grande para descarte de material biológico.

#### 5. **Procedimentos gerais para o trabalho com vetores lentivirais**

Serão utilizadas práticas de rotina empregadas em laboratórios NB2, conforme manual da ANVISA e do CIBio do IQUSP. Dentro do laboratório, é proibido, beber, comer, armazenar comida e bebida, manusear lentes de contato, passar batom, pipetar com a boca. É obrigatório o uso de EPIs. Práticas adicionais incluem as recomendações a seguir.

- a. O trabalho com os vetores lentivirais deverá ser executado somente durante o horário regular de funcionamento do laboratório (8 às 17 horas), para garantir uma resposta adequada em caso de um incidente sério.
- b. Cabine de biossegurança: O fluxo da cabine deverá ser ligado ao menos 10 minutos antes do início do trabalho para permitir várias trocas completas do ar. A luz ultravioleta deverá ser ligada também 10 minutos antes do trabalho. Desligue a luz ultravioleta e limpe a superfície da cabine com etanol 70%. Quando estiver usando duas luvas, remova o par externo e coloque no descarte de lixo biológico antes de remover as mãos da cabine. Ao final do trabalho, todos os itens devem ser removidos da cabine para descontaminação. A superfície da cabine deverá ser limpa com etanol 70%, a luz UV ligada por 10 minutos antes de desligar completamente o fluxo.
- c. Não serão utilizados perfurocortantes como pipetas Pasteur de vidro, lâminas, seringas com agulhas no trabalho com lentivírus. Para a aspiração, as tradicionais pipetas Pasteur de vidro serão substituídas por pipetas de plástico (por exemplo, Corning cat. # 4975; Falcon cat # 3575; Fisher Cat # 13-675-123)
- d. Descarte de material sólido: Tudo que tiver tido contato com soluções que contêm as partículas lentivirais será descontaminado com hipoclorito de sódio 10% antes de ser retirado da cabine de biossegurança. O material sólido será coletado num saco de lixo biológico que ficará dentro da cabine de segurança durante o trabalho com o lentivírus. As ponteiros de pipetas serão coletadas numa caixa de plástico descartável (por exemplo uma caixa de ponteira P-100 vazia) e a caixa será fechada e colocada no saco de lixo biológico (dentro da cabine de biossegurança). Ao final do trabalho, o saco de lixo biológico será fechado dentro da cabine de segurança, será borrifado com etanol 70% e será depositado num recipiente plástico para descarte de lixo biológico.
- e. Descarte de líquido: Será aspirado para um recipiente contendo 1:10 do volume de hipoclorito de sódio 10%. Ao final do trabalho, aspirar 25-50 mL de hipoclorito de sódio concentrado pela tubulação do vácuo. O recipiente do aspirado deverá ter uma concentração final de ao menos 10% de hipoclorito de sódio. Deixar o hipoclorito de sódio agir por 30 minutos antes de ser



jogado no ralo. Descarte líquido que não for aspirado deve ser tratado com hipoclorito de sódio a uma concentração final de 10% dentro da cabine. Deixar o hipoclorito de sódio agir por 30 minutos antes de ser jogado no ralo.

- f. Centrifugação: Os tubos (Falcon de 50 mL) para a centrífuga serão preparados e selados na cabine de biossegurança. É importante ressaltar que NÃO vamos utilizar ultracentrifugação. A centrifugação que empregamos é em baixa velocidade (200xg) para eliminar células e debris do sobrenadante dos lentivírus. Os tubos serão colocados no rotor dentro da cabine de segurança. Antes de remover o rotor da cabine, o rotor será limpo com etanol 70%. O rotor utilizado é de ângulo fixo da centrífuga Eppendorf 5810. O rotor contém uma tampa de contenção em caso de aerossol.

Depois da centrifugação, a tampa da centrífuga será aberta cuidadosamente e o rotor será rapidamente inspecionado para possíveis derrames que possam ter causado a formação de aerossóis. O rotor e a tampa protetora do rotor serão limpos com etanol 70% e o rotor transportado para a cabine de segurança. Ao final do processo, os rotores devem ser descontaminados.

- g. As placas de cultura usadas para a produção de partículas lentivirais serão transportadas para a incubadora (que receberá indicação de que contém partículas lentivirais) dentro de um recipiente secundário (do tipo Tupperware) fechado para proteção caso ocorra derrame de meio de cultura contendo lentivírus (veja o tópico abaixo sobre acidentes e derrames). O recipiente terá a tampa aberta, mas mantida ainda por cima do recipiente dentro da incubadora para permitir a troca de gases. Antes da remoção do recipiente contendo as placas, a tampa deve ser fechada e aberta somente na cabine de segurança.
- h. Armazenamento: As partículas lentivirais serão estocadas em vials de criogenia dentro de um recipiente secundário, a prova de congelamento e devidamente marcado com o aviso da presença de lentivírus, em freezers -80°C.

## 6. Acidentes e derrames

- a. Derrames na cabine de biossegurança. Primeiramente, deixe o fluxo funcionando para mover o aerossol através do filtro HEPA. Durante este tempo, cheque se o derrame está contido completamente dentro da cabine. Se algum EPI for contaminado, ou qualquer vazamento na contenção do derrame ocorreu além da cabine (por exemplo, gotas de líquido contendo as partículas lentivirais no chão) a resposta para conter e limpar o derrame deve ser a mesma caso o derrame tivesse ocorrido fora da cabine.

Pequenos derrames dentro da cabine (de 25 mL ou menor volume) podem ser descontaminados colocando-se camadas de folhas papel toalha embebidas em hipoclorito de sódio 10% em cima do derrame e deixando o hipoclorito agir por 20 minutos para inativar as partículas lentivirais. Deposite as folhas de papel toalha no saco para descarte de lixo biológico sólido da cabine. O hipoclorito de sódio residual pode ser removido com folhas de papel toalha embebidas em etanol 70%, e as toalhas depositadas no saco para descarte de material biológico sólido. Pequenos derrames que não envolvem exposição às pessoas não necessitam de notificação a



Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), mas exigem a notificação ao pesquisador principal que deve providenciar treinamento adicional para minimizar o risco que reincidência. Nota: Derrames de meio de cultura e tampões não contaminados com lentivírus não são considerados materiais de risco biológico, mas as folhas de papel toalha utilizadas para limpar o derrame devem ser descartadas no saco de lixo biológico sólido dentro da cabine.

Derrames de volumes grandes (volume maior que 25 mL, que provavelmente se espalham em gotas para fora da cabine) devem ser tratado com maior cuidado. Avise as pessoas que estiverem dentro da sala de cultura para evacuar a sala, remova as luvas (antes de tocar maçanetas e portas) e saia imediatamente da sala. Feche a porta, remova todos os EPIs e roupas contaminadas (cheque as mangas do avental) e coloque tudo no saco para descarte de material biológico. Todas as pessoas que estiverem na sala no momento do derrame devem lavar suas mãos e rostos, usando um detergente desinfetante. Coloque um sinal de aviso na porta alertando que houve um derrame de vetor lentiviral e que é proibido entrar na sala. Notifique o pesquisador principal sobre o ocorrido. Se tiver certeza que não houve exposição ou falha na contenção do derrame, siga os mesmos procedimentos utilizados para pequenos derrames na cabine de biossegurança. (Se tiver contado com a pele, lave a região com sabão e água por 15 minutos). A CIBio deve ser notificada. Aguarde 30 minutos para que possíveis aerossóis se assentem. Reentre na sala, cubra o derramamento com folhas de papel toalha embebidas em hipoclorito de sódio 10%. Cubra o derrame da borda para o centro. Espere 20 minutos para que as partículas virais sejam inativadas. Deposite as tochas no recipiente de descarte de material biológico. O interior da cabine de segurança deve ser completamente descontaminado (incluindo paredes internas, painel de vidro e equipamentos que estiverem dentro da capela) com hipoclorito de sódio e etanol 70%. Se o derrame chegar até ao dreno da cabine, as chapas de aço inoxidável, depois de descontaminadas, serão levantadas, apoiadas na parede interna do fundo da cabine e a superfície será descontaminada colocando-se camadas de folhas papel toalha embebidas em hipoclorito de sódio 10% em cima do derrame e deixando o hipoclorito agir por 20 minutos para inativar as partículas lentivirais. Depositar as folhas de papel toalha no saco para descarte de material biológico sólido da cabine. Remova o hipoclorito de sódio residual com etanol 70%.

- b. Pequenos derrames fora da cabine de biossegurança. Um pequeno derrame fora da cabine é definido com um derrame com baixo potencial de gerar aerossol e não apresenta risco de inalação e de contaminação do ambiente. Volumes menores que 10 mL caem nesta categoria (derrubar uma placa de 100 mm dentro de uma tupperware fechada, não consiste em derrame fora da cabine, contanto que a tupperware esteja fechada. Caso isso ocorra, levar a tupperware para a cabine de segurança e descontaminá-la). Primeiramente, averiguar rapidamente a extensão do derrame: checar se EPIs (luvas, avental, calças e especialmente sapatos estão contaminados), se houve contato com a pele ou se o líquido espirrou numa área grande. Se os sapatos estiverem visivelmente contaminados, descontamine-os com hipoclorito 10% e evacue a sala (não esquecer de remover as luvas antes de tocar na maçaneta e fechar a porta). Remova EPIs potencialmente contaminados, coloque-os num saco de descarte de material biológico, lave as mãos e rosto por 15 minutos. Coloque um sinal na porta alertando sobre o derrame e indicando a proibição da entrada. Aguarde 30 minutos para que o aerossol se assente. Avise o pesquisador principal e notifique a CIBio. Após 30 minutos, entre na sala, cubra o derrame, da periferia para o centro, com folhas de papel toalha e embeba as folhas com hipoclorito de sódio



10%. Certifique-se de procurar pequenos espirros além da área principal do derrame. Deixe as folhas de papel toalha (que foram embebidas) por 20 minutos em cima do local do derrame para inativar as partículas lentivirais. Ausentar-se da sala durante este período. Após 20 minutos de inativação, deposite as folhas de papel toalha no descarte de material biológico. Limpe o líquido residual com novas folhas de papel borrifadas com etanol 70%.

- c. Derrames de grandes volumes fora da cabine de biossegurança. Um derrame de volume grande é definido como um derrame que se espalha rapidamente, apresenta risco de inalação, coloca em risco o ambiente e envolve pessoas feridas e resgate e deve ser tratado como uma emergência. Este derrame consiste num volume de mais de 10 mL que se esparramou por uma grande área na sala de cultura, portanto, apresentando grande probabilidade de geração de aerossol e contaminação (derrubar uma placa de 100 mm dentro de uma tupperware fechada, não consiste em derrame fora da cabine, contanto que a tupperware esteja fechada. Caso isso ocorra, levar a tupperware para a cabine de segurança e descontaminá-la). Se outras pessoas estiverem na sala de cultura, alerte-os imediatamente. Averiguar a extensão do derrame: contato com a pele, sapatos e solas de sapatos, contaminação de EPIs. Se os sapatos forem atingidos pelo derrame, descontamine-os com hipoclorito de sódio 10% antes de sair da sala (caso os sapatos estiverem extensivamente contaminados, removê-los antes de sair da sala e calce as alpargatas do Kit anti-derrame). Depois de remover as luvas, evacue a sala e feche a porta ao sair. Remova todos os EPIs, lave as mãos e rosto extensivamente. Coloque um sinal de alerta que houve um derrame de lentivírus e que é proibido a entrada. Aguardar 30 minutos para que o aerossol se assente. Durante este intervalo, notifique o pesquisador principal e a CIBio. Se for muito difícil lidar com o derrame sozinho, procure ajuda com outros membros do laboratório qualificados para o trabalho com lentivírus e com a CIBio. Depois de 30 minutos, colocar EPIs limpos, entrar na sala, cobrir o derrame com folhas de papel toalha, da periferia para o centro do derrame, e embeber as folhas com hipoclorito de sódio 10%. Aguarde 20 minutos para a inativação das partículas virais. Se tiver alguma vidraria quebrada associada com o derrame, colete os cacos de vidro com uma pinça e transfira-os para um recipiente de descarte de vidro quebrado. A chance de quebra de vidraria associada ao derrame é bastante remota já que serão utilizados para o trabalho com lentivírus somente material plástico (recipientes, placas, pipetas, etc). Limpe qualquer líquido residual com folhas de papel toalha borrifadas com etanol 70%.
- d. Acidentes: Eventos que incluem a liberação de vírus por falha de equipamento (por exemplo, a quebra de um tubo na centrífuga) ou contato com ferimentos.
- i. Acidentes durante a centrifugação: Se há suspeita de quebra ou abertura acidental de um tubo (provavelmente haverá um barulho estranho e/ou a centrífuga será automaticamente desligada por não estar mais balanceada), mantenha a tampa da centrífuga fechada para que o aerossol se assente. Durante este intervalo, avise o pesquisador principal. Após 30 minutos, abra a centrífuga cuidadosamente e cheque a integridade do rotor e da tampa de contenção do rotor. Se rotor e tampa estiverem intactos, borrifem-os com etanol 70% e transporte o rotor com a tampa para dentro da cabine de biossegurança. Se algum tubo quebrou, descontamine o tubo e todo o rotor com hipoclorito de sódio 10% dentro da cabine. Se houver um vazamento aparente dentro da centrífuga, descontamine a câmara da centrífuga cuidadosamente: adicione folhas de papel toalha para absorver qualquer



derrame e borrife um grande volume (aproximadamente 500 mL) de hipoclorito de sódio 10% nas paredes e na parte de dentro da tampa da centrífuga. O desinfetante formará uma poça no fundo da câmara da centrífuga. Feche e mantenha a centrífuga fechada por 20 minutos. Enxugar todo o desinfetante com várias folhas de papel toalha. Limpar o líquido residual com papel toalha borrifado com etanol 70%. No caso de uma falha de grandes proporções (o rotor se desprender durante a centrifugação liberando partículas virais por toda a câmara da centrífuga). Manter a tampa da centrífuga fechada por 30 minutos. Durante este intervalo de tempo, notificar o pesquisador principal e contato da CIBio. Se a contaminação for muito extensa, procure ajuda com outro membro do laboratório treinado para o trabalho com vetores lentivirais e também procure assistência com o CIBio. O procedimento de descontaminação é similar ao que é realizado em caso de derrame de grandes volumes fora da cabine de biossegurança. Colocar folhas de papel toalha dentro da centrífuga e embebê-las com hipoclorito de sódio 10%. Borrife toda a parte de dentro da centrífuga com etanol 70%, feche a tampa da centrífuga e espere 20 minutos para inativação do lentivírus.

- ii. Perfurocortantes: Não serão utilizadas em etapa alguma do trabalho com vetor lentiviral. E, antes do início do trabalho com o vetor lentiviral, a cabine de biossegurança será inspecionada e qualquer objeto que possa perfurar e/ou cortar, como pipetas Pasteur de vidro, serão removidos da capela. Entretanto, se algum membro do laboratório infringir a regra, utilizar perfurocortantes, ele(a) deverá sangrar a região atingida (espremer para gerar algumas gotas de sangue), lavar extensivamente a ferida com água e sabão por 15 minutos. O acidente deve ser relatado o mais rápido ao pesquisador principal e ao CIBio.
- iii. Outros acidentes, escorregões, quedas ou colisões que podem levar ao derrame de partículas lentivirais. Pode ser necessário a assistência de outro membro do laboratório em caso de ferimento. Neste caso, a pessoa que irá ajudar deve estar ciente de partículas lentivirais. No caso de um acidente com ferimentos graves associado ao derrame de lentivírus, o sistema de atendimento de emergência (192), além da CIBio e o pesquisador principal, devem ser acionados.

### ***Recomendações aos profissionais de saúde que venha atender a pessoa afetada pela exposição aos vetores lentivirais***

As drogas antirretrovirais, além de serem usadas como a forma principal para o tratamento da infecção de HIV, são também empregadas para a profilaxia pós-contato (PPC) quando há alto risco de exposição ao vírus. Considerando-se os riscos potenciais de uma infecção por vetores lentivirais e a eficiência e segurança das novas drogas anti-HIV, é recomendado pela American College of Occupational and Environmental Medicine (Schlimgen et al., 2016) que profissionais de saúde considerem o uso de PPC em casos de exposição séria ao vetor lentiviral, após discussão com a pessoa afetada sobre os riscos e benefícios da terapia antirretroviral. Embora não há evidências diretas que corroborem esta recomendação, a experiência da aplicação de PPC nos casos de exposição ao HIV reforça a ideia que PPC deve ser utilizado em casos de contato sério com vetores lentivirais (Kuhar et al., 2013 e Fonner et al., 2016). É importante salientar que se decidido tratar a pessoa afetada, não há dados na literatura que embasam um regime específico e a duração do tratamento profilático. Com base na biologia dos vetores lentivirais, recomenda-se o uso de um inibidor de integrase em conjunto ou não com um nucleot(s)ídeo



inibidor de transcriptase reversa. Não há dados há respeito do número ideal de drogas para PPC, mas dado o risco teórico de exposição ao vetor lentiviral e o risco baixo, mas concreto, do tratamento com antirretrovirais, indica-se o uso de PPC com um único medicamento, o inibidor de integrase (que apresenta o melhor perfil de segurança entre todos os antirretrovirais). Conhecendo-se o ciclo de infecção do HIV, entende-se porque alguns antirretrovirais atuais podem ser eficientes para o tratamento em caso de contato com vetores lentivirais. Os antirretrovirais atuais para HIV incluem nucleos(t)ídeos inibidores de transcriptase reversa (NITR), não-nucleosídeos inibidores de transcriptase reversa (NNITR), inibidores de protease, inibidores de fusão, inibidores de incorporação (ex. antagonista do co-receptor CCR5) e inibidores da integrase de HIV. Destes medicamentos, somente os NITRS e inibidores de integrase de HIV poderiam agir nas vias ainda contidas nos vetores lentivirais. As outras drogas não trariam benefício no PPC em caso de contato com vetor lentiviral. As partículas lentivirais são geralmente pseudotipadas com uma proteína envelope heteróloga, descartando-se assim a possibilidade de se usar inibidores de incorporação e fusão como terapias. Os lentivírus não contém genes para a replicação e para a expressão da proteína Gag, de modo que inibidores de protease não seriam eficientes. A discussão com o indivíduo afetado e com a equipe de atendimento médico deverá incluir o risco potencial de mutagênese por inserção e oncogênese. Deve ser enfatizado que não há casos reportados de efeitos adversos deste tipo por exposição laboral, mas que efeitos adversos podem ser de difícil detecção já que podem aparecer anos depois após o contato com o vetor lentiviral e podem ser mascarados, por exemplo, por um tumor que ocorre naturalmente. A conversa deve também salientar que o tratamento sugerido é baseado no protocolo de PPC para HIV que tem demonstrado reduzir o risco de infecção por HIV imediatamente após o contato, mas que ainda não foi clinicamente testado como prevenção de mutagênese insercional por integração de um vetor lentiviral. Se for decidido tratar o indivíduo com terapia antiretroviral, recomenda-se um tratamento de 7 dias com um inibidor de integrase, combinado ou não com um NITR. O tratamento deve ser iniciado o mais rápido possível, mas dentro de 72 horas pós contato com o lentivírus. Atualmente, recomenda-se 28 dias de PPC para HIV (Kuhar et al., 2013), mas há diferenças cruciais entre vetores lentivirais e HIV; i) as terceira e quarta gerações de vetores lentivirais apresentam um risco muito baixo de gerarem vírus competentes em replicação em contraste ao HIV que é capaz de se replicar; ii) somente a primeira rodada de integração do lentivírus apresenta risco. Como os vetores lentivirais não podem replicar, riscos além da integração são considerados muito baixo. A integração deve ocorrer dentro de poucas horas após o contato, portanto, tratamentos mais longos que 7 dias não devem trazer benefícios adicionais; iii) um número maior de drogas é geralmente prescrito para PPC para HIV porque o perfil de resistência a droga é desconhecido, e há chances significativas de haver cepas de HIV em circulação resistentes a uma ou mais drogas (Kuhar et al., 2013). Como o objetivo principal do tratamento é a prevenção do evento de integração do vetor, o tratamento deve começar o mais rápido possível, imediatamente ou dentro de 2 horas. Após 72 horas, não há provavelmente benefício já que os lentivirus terão entrado nas células ou terão sido eliminados (Schlimger et al., 2016).

### ***Plano de resposta em caso de incidentes de exposição aos vetores lentivirais***

*O nosso laboratório desenvolveu um plano de resposta em caso de incidentes graves no trabalho com vetores lentivirais (descrito no tópico seguinte) seguindo as recomendações da ACOEM (Schlimger et al., 2016). Este plano será disponibilizado a equipe médica responsável pelo atendimento do indivíduo que for afetado no incidente.*



**Informação sobre o agente biológico:** Vetores lentivirais são vetores de vírus de RNA de fita única derivados do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) que retêm a capacidade de integração ao genoma das células infectadas.

**Sistemas de vetores lentivirais utilizados no laboratório:**

- Vetor lentiviral não replicante pCTH-EF1-MCS-T2Apuro (System Biosciences, cat#CD500)
- Vetor lentiviral não-replicante de expressão induzível Lenti-X Tet-One (Clontech, cat#631847)

**Informação sobre o transgene (gene inserido no vetor):**

Genes selvagens e mutantes (com ganho ou perda de função) da via Hippo-YAP. YAP, apesar de não ser considerado um *oncogene* clássico (como RAS e cMYC), já foi associada em diversos trabalhos a tumorigênese em cultura de células e modelos animais. A proteína produto do gene YAP atua na ativação de genes relacionadas à proliferação, sobrevivência e diferenciação de células. Hippo é um conjunto de kinases cujo atividade inibe YAP. Portanto as kinases Hippo são candidatas em potencial a *supressores de tumor*.

**Risco da Exposição:**

- *Mutagênese insercional*- dependendo do local no genoma de integração, o vetor lentiviral pode danificar a regulação do desenvolvimento e proliferação das células, afetando a função das células podendo levar a oncogênese.
- *Oncogênese direta pelo transgene*- os transgenes são genes com provável potencial oncogênico ou de supressão de tumores, o que pode induzir a transformação oncogênica das células afetadas.
- *Geração de retrovírus competentes em replicação*- os vetores lentivirais que utilizamos não são capazes de replicar, mas podem sofrer uma série de eventos de baixa probabilidade que podem revertê-los para retrovírus com potencial replicativo.

**Rotas de transmissão:**

- Inoculação parenteral direta.
- Contato com mucosas e pele com feridas.
- Contato direto a uma distância curta com gotículas de aerossol formadas por derrame fora da cabine de biossegurança.

**Resposta**

- **Contato com a pele intacta (sem feridas):** Lave imediatamente a área afetada com água abundante e corrente e sabão para diluir e remover as partículas lentivirais da pele.
- **Resposta em caso de contato com a pele não intacta (com feridas):** Lave imediatamente a área afetada com água abundante e corrente e sabão para diluir e remover as partículas lentivirais da pele.
- **Contato com mucosas:** Lave imediatamente com água corrente por pelo menos 15 minutos



- **Contato com gotículas formadas por aerossol:** O mesmo procedimento acima, dependendo da área afetada.

#### **Primeiros socorros:**

- Ligue imediatamente para o serviço de atendimento de emergência (192) em caso de ferimentos graves
- Profilaxia pós contato (PPC) (baseado em discussão prévia com os membros do laboratório) deve ser oferecida. Iniciar o mais rápido possível (o ideal nas primeiras horas após o incidente) um tratamento de 7 dias com um nucleos(t)ídeo inibidor de transcriptase reversa (como o tenofovir) e um inibidor de integrase (como o raltegravir or dolutegravir). Observar e tratar efeitos adversos do contato com o vetor lentiviral. O incidente deve ser notificado ao pesquisador principal e ao CIBio.

#### ***Protocolo para a produção de partículas lentivirais***

As partículas dos vetores lentivirais serão transfectadas e produzidas em células HEK293 de acordo com protocolos recomendados pelos fabricantes Systems Biosciences

([https://www.systembio.com/downloads/Manual\\_pCDH\\_Vector\\_v5.pdf](https://www.systembio.com/downloads/Manual_pCDH_Vector_v5.pdf)) e Clontech

([http://www.clontech.com/BR/Products/Viral\\_Transduction/Lentiviral\\_Vector\\_Systems/Tet-Inducible?sitex=10028:22372:US](http://www.clontech.com/BR/Products/Viral_Transduction/Lentiviral_Vector_Systems/Tet-Inducible?sitex=10028:22372:US)).

As instruções para contenção, segurança e descontaminação em caso de derrames serão seguidas conforme descrito acima. É importante salientar que os volumes de meio do trabalho com os vetores lentivirais nunca serão maiores que 100 mL e que as partículas NÃO serão concentradas.



### *Referências*

- Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors. National Institute of Health-Office of Science Policy: [http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/resources/Lenti\\_Containment\\_Guidance.pdf](http://osp.od.nih.gov/sites/default/files/resources/Lenti_Containment_Guidance.pdf)
- Eberle J, Habermann J, Gürtler LG. HIV-1 infection transmitted by serum droplets into the eye: a case report. *AIDS*. 2000 Jan 28;14(2):206-7
- Fonner VA, Dalglish SL, Kennedy CE, et al. Effectiveness and safety of oral HIV pre-exposure prophylaxis (PrEP) for all populations: a systematic review and meta-analysis. *AIDS* 2016; 30:1973–1983.
- Kuhar DT, Henderson DK, Struble KA, et al. Updated US Public Health Service guidelines for the management of occupational exposures to human immunodeficiency virus and recommendations for postexposure prophylaxis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; 34:875–892
- Moroishi T, Hansen CG, Guan KL. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Feb;15(2):73-9
- Schlimgen R, Howard J, Wooley D, Thompson M, Baden LR, Yang OO, Christiani DC,
- Mostoslavsky G, Diamond DV, Duane EG, Byers K, Winters T, Gelfand JA, Fujimoto G, Hudson TW, Vyas JM. Risks Associated With Lentiviral Vector Exposures and Prevention Strategies. *J Occup Environ Med*. 2016 Dec;58(12):1159-1166



**Anexo: Cartões listando procedimentos operacionais padrão em caso de derrame**

**(Estão cartões serão postados na sala de cultura e dentro do kit em caso de derrame)**

**Derrames na Cabine de Biossegurança**

**A. Limpeza de derrame pequeno (<25 mL):**

1. Certifique-se que o fluxo laminar cabine está funcionando. Espere 5 minutos, para que o aerossol seja aspirado através do filtro HEPA.
2. Descontamine as superfícies dentro da cabine. Com o EPI vestido, cubra com cuidado o derrame com papel toalha absorvente e aplique hipoclorito de sódio 10%. Comece pelas bordas do derrame. Espere 20 minutos, para que o hipoclorito inative a partículas lentivirais, antes de limpar completamente.
3. Descarte o papel toalha embebido num saco de descarte de material biológico alocado na cabine de biossegurança. Remova qualquer resíduo com papel toalha. Limpe a superfície com papel toalha borrifado com etanol 70% e descarte o papel no saco de descarte de material biológico alocado da parte interna da cabine.
4. Deixe o fluxo ligado por 5 minutos para que o ar circule no filtro HEPA

**B. Limpeza de derrame grande (>25 ml):**

1. Evacue a sala, segurando a respiração para que não respire qualquer aerossol.
2. Feche a porta da sala
3. Remova o EPI e qualquer vestimenta que for contaminada e coloque num saco plástico e sele
4. Coloque um alerta na porta: NÃO ENTRE —derrame de lentivírus!
5. Todos que estiverem na sala de cultura no momento do derrame, devem lavar mãos e rostos com muita água e sabão desinfetante.
6. Espere 30 minutos para que o aerossol assente. Durante este tempo, notifique o Pesquisador Principal. Se o derrame alcançar o lado de fora da cabine, proceda como se o derrame tivesse ocorrido do lado da fora da cabine.
7. Limpe conforme recomendado para pequenos derrames; descontamine todos os equipamentos e materiais dentro da cabine e limpe toda a superfície que foi potencialmente contaminada.
8. Se um grande volume foi derramado, a cabine inteira, incluindo o sistema do fluxo laminar, deverá ser descontaminado.



## Derrames do lado de fora da cabine de biossegurança

### **A. Limpeza de derrame pequeno (<10 ml, localizado numa pequena área):**

1. Alerte as pessoas que estiverem na sala de cultura
2. Verifique cuidadosamente a extensão do derrame—cheque os seus sapatos! Descontamine-os se necessário
3. Evacue a sala. Feche a porte. Descarte EPI potencialmente contaminado e remova qualquer vestimenta contaminada. Lave vigorosamente as mãos e rosto.
4. Coloque um alerta na porta: NÃO ENTRE- derrame de lentivírus!
5. Espere 30 minutos. Durante este tempo, avise o Pesquisador Principal.
6. Vista um novo EPI: avental, luvas, máscara e óculos de proteção.
7. Entre na sala, cubra o derrame com papel toalha, comece da borda para o centro do derrame.
8. Molhe as folhas de papel toalha com hipoclorito de sódio 10%.
9. Espere 20 minutos para que o hipoclorito inative as partículas lentivirais.
10. Coloque as folhas de papel toalhas utilizadas num saco para descarte de material biológico.
11. Limpe o líquido remanescente com papel toalha. Descarte no saco para descarte de material biológico.
12. Limpe a área do derrame com papel toalha borrifado com etanol 70%. Descarte no saco para descarte de material biológico.
13. Em conjunto com o pesquisador principal, prepare um relatório sobre o ocorrido e submeta-o à CIBio.

## Derrames do lado de fora da cabine de biossegurança

### **B. Limpeza de derrame grande (>10 mL, esparramado por uma área grande):**

1. Alerte as pessoas que estiverem na sala de cultura
2. Verifique cuidadosamente a extensão do derrame—cheque os seus sapatos! Descontamine-os se necessário
3. Evacue a sala. Feche a porte. Descarte EPI potencialmente contaminado e remova qualquer vestimenta contaminada.  
Lave vigorosamente as mãos e rosto. Se houver contato com os olhos, use o lavador de olhos.
4. Coloque um sinal de alerta na port: NÃO ENTRE- Derrame de lentivírus
5. Espere 30 minutos. Durante este tempo, avise o Pesquisador Principal e a CIBio
6. Se ajuda for necessária, discuta com o Pesquisador principal e a CIBio
7. Vista EPI novos: avental, luvas, máscara e óculos de segurança
8. Entre na sala, cubra o derrame com papel toalha, comece da borda para o centro
9. Molhe as folhas de papel toalha com 10% hipoclorito de sódio.
10. Espere 30 minutos para que as partículas lentivirais sejam inativadas por hipoclorito de sódio
11. Continue a limpeza: as folhas de papel toalha devem ser jogadas no saco para descarte de material biológico.
12. Limpe qualquer resíduo remanescente. Deposite o papel usado no saco para descarte de material biológico.
13. Limpe toda a área do derrame com papel toalha embebido em etanol 70%.
14. Em conjunto com o pesquisador principal, prepare um relatório sobre o ocorrido e submeta-o à CIBio.



## Situações especiais

### Na incubadora:

#### *Contaminação do recipiente de água—*

1. Adicione hipoclorito de sódio para a concentração final de 10%; aguarde 30 minutos.
2. Descontamine a incubadora como se fosse um derrame pequeno fora da cabine de biossegurança
3. Depois da descontaminação, faça o procedimento rotineira de limpeza da incubadora.
4. Escreva um relatório do ocorrido junto com o pesquisador principal e submeta à CIBio.

### Centrífuga:

1. Abra a incubadora devagar e com muito cuidado.
2. Se não houver sinal de vazamento, borrife o rotor com etanol 70% e abra o rotor cuidadosamente dentro da cabine. Se o rotor for contaminado, descontamine-o na cabine. Como uma medida precaução, descontamine toda a câmara da centrífuga.
3. Se o rotor estiver danificado ou a tampa protetora do rotor estiver aberta, feche a tampa da centrífuga. Alerta as pessoas que estiverem na sala. Evacue a sala. Coloque um sinal na porta: NÃO ENTRE- Derrame de lentivírus! Espere 30 minutos. Durante este período, notifique o pesquisador principal e a CIBio. Se assistência for necessária, discuta com o pesquisador principal e com a CIBio. Abra a tampa da centrífuga devagar e com cuidado, adicione folhas de papel toalha, coloque ~0.5 L de hipoclorito de sódio 10% para saturar as folhas de papel. Borrife as paredes da câmara da centrífuga e do rotor com etanol 70%. Feche a centrífuga e espere 20 minutos. Termine de limpar da mesma forma que é feita para derrames fora da cabine. Transporte o rotor para a cabine. Abra e descontamine rotor na cabine. Escreva um relatório do ocorrido junto com o pesquisador principal e submeta à CIBio.