



NORMA TÉCNICA

L5.519

Mai/1993
19 PÁGINAS

Poliovirus - caracterização intratípica através da técnica de hidribização por "dot blot": método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	<p style="text-align: center;">POLIOVÍRUS - CARACTERIZAÇÃO INTRATÍPICA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO POR "DOT BLOT" Método de ensaio</p>	<p style="text-align: center;">L5.519 MAIO/93</p>
--------	---	--

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	3
5 Execução do ensaio.....	12
6 Resultados.....	14
Anexo A - Recomendações de ordem geral.....	15
Anexo B - Referências bibliográficas.....	18

INTRODUÇÃO

A relação entre a ocorrência de enterovírus em águas de esgoto e a incidência clínica da doença na comunidade tem sido reconhecida e estudada por mais de 30 anos, sendo o principal objetivo da maioria dessas investigações a detecção de poliovírus. Eles foram empregados em diversos estudos de vigilância epidemiológica, e os resultados dessas pesquisas mostram a existência de uma correlação entre o isolamento de poliovírus de águas de esgoto, o isolamento de vírus das fezes e o número de casos clínicos reconhecidos na comunidade.

Nas últimas décadas, vários trabalhos têm sido publicados sobre o isolamento de vírus de amostras ambientais em diferentes partes do mundo e os resultados dessas pesquisas tiveram aplicações variáveis. Muitos desses estudos tem fornecido dados epidemiológicos importantes sobre a prevalência e os tipos de vírus que estão circulando na comunidade, no entanto, o sucesso desses estudos está associado à seleção de metodologias apropriadas para a concentração, isolamento e identificação dos vírus das amostras ambientais, como também, a utilização de testes sensíveis específicos para diferenciar os poliovírus naturais (selvagens) dos vacinais.

Durante os últimos anos, os poliovírus tem sido evidenciados em amostras ambientais, através da utilização de métodos de concentração e técnicas com culturas de tecidos. No entanto, os recentes avanços ocorridos na área de virologia molecular tem contribuído significativamente para a implantação de metodologias bastante sensíveis, rápidas e de custo relativamente baixo.

A técnica de hibridização por "dot blot", que utiliza sondas genéticas, é um método rápido, sensível, relativamente simples, para diferenciar intratipicamente diversas amostras de poliovírus isolados de amostras ambientais.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os procedimentos que permitem caracterizar intratipicamente amostras de poliovírus.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Para aplicação desta Norma pode ser necessário consultar:

- M1.002 - Lavagem, Preparo e Esterilização do Material para Cultura Celular.
- L5.504 - Identificação de Enterovírus.
- L5.009 - Segurança e Higiene do Trabalho em Laboratório de Microbiologia.
- L5.215 - Prova de Adequabilidade Biológica da Água Destilada para fins Microbiológicos.
- CNEN-NE-3.01 - Diretrizes Básicas de Radioproteção.

3 DEFINIÇÕES

3.1 Autoradiografia

Método para localização de moléculas radioativas pela sobreposição de um filme radiográfico sobre a amostra. Pontos escuros que se desenvolvem no filme indicam as posições do material radioativo na amostra original.

3.2 DNA

Ácido desoxirribonuclêico.

3.3 "Dot Blot"

Aplicação do material genético da amostra em teste, em forma de ponto, sobre um filtro que poderá ser subsequenteemente marcado pela hibridização. Usualmente várias amostras distintas são aplicadas em um mesmo filtro e cada uma corresponde a um ponto diferente.

3.4 Hibridização

Processo de complementariedade de pares de bases entre duas cadeias de material genético de fita simples.

3.5 p.a.

Para análise.

4.1.6 Congelador

Com regulagem para manter a temperatura na faixa de -20°C e -70°C . É destinado ao armazenamento de soluções e dos concentrados das amostras. A limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.7 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram na multiplicação celular.

4.1.8 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, frascos para reagentes e meios de cultura e toda vidraria e aparelhagem que pode ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade suficiente para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termômetro e um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180°C . O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 4 a 6 horas, à temperatura de 170 a 180°C .

4.1.9 Fonte de pressão

Bomba de vácuo e pressão ou outro dispositivo conveniente para produzir uma pressão de $1,0 \text{ kgf/cm}^2$.

4.1.10 Frascos com capacidade de 1 000,0 mL com tampa de rosca para armazenamento de meio de cultura

4.1.11 Mangueiras de borracha

Com parede espessa, resistentes à pressão.

4.1.12 Materiais para preparação de meios de cultura e reagentes

Recipientes de vidro neutro ou aço inoxidável. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.1.13 Membranas filtrantes

De éster de celulose, com porosidade de $0,22 \mu\text{m}$ e $0,45 \mu\text{m}$ e diâmetro de 142 mm e de nitrocelulose de $0,45 \mu\text{m}$ com $315 \times 640 \text{ mm}$.

4.1.14 Papel de alumínio

4.1.15 Papel filtro

4.1.16 Papel Kraft

4.1.17 Pera de sucção ou pipetador de segurança

4.1.18 Pinça dente de rato

4.1.19 Pinça de pontas retas e bordas lisas

4.1.20 Pincel demarcador

Para escrita em vidro.

4.1.21 Placa agitadora magnética

Com velocidade regulável.

4.1.22 Micropipetador automático

Ou outro dispositivo de segurança para sucção de conteúdos líquidos, com regulagem variável para 20 μ L a 1 000 μ L.

4.1.23 Pré-filtro de fibra de vidro

Tipo AP-20, com diâmetro de 142 mm.

4.1.24 Pisseta

Para álcool etílico a 70%.

4.1.25 Protocolos

Para registro dos testes.

4.1.26 Provetas graduadas

Com marcação externa, nos volumes de 100,0, 250,0, 500,0, 1 000,0 e 2 000,0 mL.

4.1.27 Porta-filtros

De aço inoxidável, diâmetro de 142 mm.

4.1.28 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão mínima de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH 4,0; pH 6,86 e pH 9,18.

4.1.29 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C, com capacidade para comportar recipientes com os meios de cultura e soluções a serem mantidos sob refrigeração. Sua limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.30 Vasilhames de pressão

De aço inoxidável, com capacidade para 5 litros.

4.1.31 Alcoômetro4.1.32 Algodão hidrófilo4.1.33 Bandejas de aço inoxidável4.1.34 Braçadeiras

Tipo rosca sem fim de 1" e 1/2".

4.1.35 Barra magnética

Recoberta com teflon, tamanho 6 cm x 1 cm.

4.1.36 Chaves especiais para porta-filtros

4.1.37 Tubos Eppendorf de 0,5 e 1,5 μ L

4.1.38 Bico de Bunsen

4.1.39 Etiquetas

4.1.40 Fita crepe

4.1.41 Fita crepe especial

Para controle do material submetido à esterilização, estufa ou autoclave.

4.1.42 Estantes para tubos Eppendorf

4.1.43 Tripé

4.1.44 Tela de amianto

De tamanho 22 x 22 cm.

4.1.45 Seladora tipo Lorenzetti

4.1.46 Microcentrífuga para tubos Eppendorf

Com capacidade para 14 000 rpm.

4.1.47 Sistema "manifold" ("Blot hybridization manifold")

De plástico não tóxico, composto de 3 partes com 96 orifícios.

4.1.48 "Hot shaker"

4.1.49 Contador Geiger

4.1.50 Sacos plásticos não tóxicos

4.1.51 Cassete para exposição de filme Raio X

De aproximadamente 16 cm x 21 cm.

4.1.52 Filme para Raio X Médico

De 13 cm x 18 cm.

4.1.53 Intensificador para filme de Raio X

4.1.54 Revelador para filme de Raio X

4.1.55 Fixador para filme de Raio X

4.1.56 Sabão descontaminante de radioatividade

4.1.57 Placa dupla de acrílico para manuseio de material radioativo

4.1.58 Luvas descartáveis

4.1.59 Ponteiras para micropipetadores

4.1.60 Etiquetas de identificação de material radioativo4.2 Soluções4.2.1 Reagentes

4.2.1.1 Para o preparo das soluções utilizadas nesse ensaio são os seguintes os reagentes necessários:

- a) ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP;
- b) citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) p.a.;
- c) cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.;
- d) cloreto de sódio (NaCl) p.a.;
- e) ditiotreitól (DTT) p.a.;
- f) dodecil sulfato de sódio (SDS) p.a.;
- g) ficol p.a.;
- h) formaldeído p.a.;
- i) fosfato de sódio (Na_2HPO_4) p.a.;
- j) hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;
- k) polivinilpirrolidona p.a.;
- l) soroalbumina bovina fração V. p.a.;
- m) T_4 - polinucleotídeo quinase ($10\mu/\mu\text{L}$);
- n) tris-HCl. p.a.;
- o) sonda específica para o grupo enterovírus; e
- p) sonda específica para os poliovírus tipos 1, 2 e 3 de Sabin.

4.2.1.2 Os reagentes devem ser de grau bacteriológico e procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalterados, ser livres de elementos bactericidas ou bacteriostáticos inespecíficos bem como de carboidratos inespecíficos.

4.2.2 Preparo de soluções4.2.2.1 Solução de Denhardt 50xFórmula:

Ficol p.a.....	5,0 g
Polivinilpirrolidona p.a.....	5,0 g
Soroalbumina bovina fração V. p.a.....	5,0 g
Água ultra pura q.s.p.....	500,0 mL

Preparo:

Dissolver todos os componentes em água ultra pura, sob agitação constante, até completa dissolução. Completar o volume final para 500,0 mL. Esterilizar por filtração em membrana de éster de celulose de $0,22\ \mu\text{m}$ de porosidade. Distribuir a solução filtrada em volumes de 25,0 mL. Estocar a -20°C .

4.2.2.2 Solução de fosfato de sódio 1,0MFórmula:

Fosfato de sódio (Na_2HPO_4) p.a.....	14,2 g
Água ultra pura q.s.p.....	100,0 mL
pH final: 7,0	

Preparo:

Dissolver 14,2 g de fosfato de sódio em água ultra pura. Completar o volume para 100,0 mL. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.2.2.3 Solução de hidróxido de sódio 10NFórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.....	400,0 g
Água destilada estéril q.s.p.....	1 000,0 mL

Preparo:

Em um balão volumétrico, dissolver 400,0 g de hidróxido de sódio em cerca de 800,0 mL de água destilada. Agitar até completa dissolução. Completar o volume final para 1 000 mL.

4.2.2.4 Solução tampão de enzima 10x

Na preparação da solução tampão de enzima devem ser utilizadas três soluções preparadas da seguinte forma:

a) Solução A: Solução tampão Tris-HCl 1,0MFórmula:

Tris-HCl p.a.....	15,76 g
Água ultra pura q.s.p.....	100,0 mL
pH final: 7,6	

Preparo:

Dissolver 15,76 g de Tris-HCl em água ultra pura. Completar o volume para 100,0 mL. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

b) Solução B: Solução de cloreto de magnésio 1,0MFórmula:

Cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) p.a.....	20,33 g
Água ultra pura q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver 20,3 g de cloreto de magnésio em água ultra pura. Completar o volume para 100,0 mL. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

c) Solução C: Solução de ditioneitol 1,0MFórmula:

Ditioneitol (DTT) p.a.....	1,54 g
Água ultra pura q.s.p.....	10,0 mL

Preparo:

Dissolver 1,54 g de ditioneitol em água ultra pura. Completar o volume para 10,0 mL.

d) Preparo final da solução tampão de enzima 10xFórmula:

	Quantidade (µL)
Solução A (Tris-HCl 1,0M).....	200
Solução B (Cloreto de magnésio 1,0M).....	100
Solução C (Ditioneitol 1,0M).....	50
Água ultra pura estéril.....	650

Preparo:

Acrescentar em 650 µL de água ultra pura estéril, as soluções A, B e C nos volumes indicados. Agitar e estocar a -20°C.

4.2.2.5 Solução tampão de hibridizaçãoFórmula:

	Quantidade (mL)
Solução tampão SSC 20x.....	150,0
Solução de fosfato de sódio 1,0M.....	25,0
Solução de Denhardt 50x.....	50,0
Solução de SDS a 10%.....	5,0
Água ultra pura q.s.p.....	270,0

Preparo:

Dissolver todos os componentes, na ordem indicada em água ultra pura, sob agitação constante, até completa dissolução. Completar o volume final para 270,0 mL.

4.2.2.6 Solução tampão de lavagem SSC2x com 0,1% de SDSFórmula:

	Quantidade (mL)
Solução tampão SSC 20x.....	200,0
Solução de SDS a 10%.....	20,0
Água ultra pura q.s.p.....	2 000,0

Preparo:

Dissolver 200,0 mL da solução tampão SSC 20x em 1600,0 mL de água ultra pura, sob agitação constante, até completa dissolução. Acrescentar 20,0 mL da solução de SDS a 10%. Após dissolução, completar o volume final para 2000,0 mL com água ultra pura.

4.2.2.7 Solução tampão SSC 20xFórmula:

Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	175,3 g
Citrato de sódio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .H ₂ O) p.a.....	88,2 g
Solução de hidróxido de sódio 10N.....	quantidades menores que 1 mL
Água ultra pura q.s.p.....	1 000,0 mL
pH final: 7,0	

Preparo:

Dissolver 175,3 g de cloreto de sódio e 88,2 g de citrato de sódio, em água ultra pura. Acertar o pH para 7,0, com algumas gotas de hidróxi do de sódio 10N. Completar o volume final para 1 000,0 mL. Distribuir volumes de 200,0 mL. Esterilizar em autoclave, a 121°C durante 15 minu tos.

4.2.2.8 Solução tampão SSC 10xFórmula:

Quantidade (mL)

Solução tampão SSC20x.....	50,0
Água ultra pura q.s.p.....	50,0

Preparo:

Misturar 50,0 mL da solução tampão SSC 20x com 50,0 mL de água ultra pura. Agitar para dissolução. Esterilizar em autoclave a 121°C duran te 15 minutos.

4.2.2.9 Solução de SDS a 10%Fórmula:

SDS (Dodecil sulfato de sódio) p.a.....	10,0 g
Água ultra pura q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Dissolver 10,0 g de SDS em água ultra pura, sob agitação constante, até completa dissolução. Completar o volume final para 100,0 mL. Este rilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.2.2.10 Reação para Marcação das Sondas Específicas com (γ^{32} P) ATPFórmula:

Solução tampão de enzima 10x.....	1,0 μ L
Sonda específica (0,1 μ g/ μ L).....	1,0 μ L
T4 polinucleotídeo quinase (10 unidades/ μ L).....	0,5 μ L
(γ^{32} P) ATP.....	100,0 μ Ci
Água ultra pura.....	7,5 μ L

Preparo:

Acrescentar em um tubo de microcentrífuga (Eppendorf), 7,5 µL de água ultra pura, 1,0 µL da solução tampão de enzima 10x, 1,0 µL da sonda específica e 0,5 µL da enzima. Homogeneizar e misturar esta solução com 100 µCi de ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP. Homogeneizar vigorosamente e centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto (Centrifuge 5415 Eppendorf, Brinkmann). Incubar a mistura a 37°C por 30 minutos e a 90°C durante 10 minutos. Centrifugar novamente. Manter a mistura em banho de gelo durante o uso.

Nota: Durante toda a realização da reação obedecer as instruções descritas na Norma CNEN-NE-3.01 - Diretrizes básicas de radioproteção.

4.3 Esterilização das soluções e meios de cultura

4.3.1 Filtração

A filtração de soluções ou de meios de cultura que contêm substâncias termolábeis, é feita com pressão positiva ou vácuo, usando-se membranas de éster de celulose acopladas, com as seguintes porosidades: 0,45 µm e 0,22 µm. Membranas clarificantes de fibra de vidro, podem também ser incluídas e, as de tipo AP-20 são as mais indicadas. A montagem das membranas deve ser feita obedecendo uma ordem decrescente de porosidade. Todos os materiais e equipamentos utilizados para a filtração deverão ser esterilizados previamente por autoclavação a 121°C durante 30 minutos.

4.3.2 Autoclavação

Esterilizações de soluções ou de meios de cultura em autoclave devem ser feitos em temperatura de 121°C durante 15 minutos. Durante a autoclavação de meios de cultura, não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonização, caramelização ou outro tipo de destruição das substâncias que constituem os meios de cultura.

4.4 Armazenamento de soluções

As soluções são armazenadas em refrigerador (2 a 8°C) ou em congelador (-20°C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolhas de borracha ou tampa de rosca, pois os tampões de algodão podem permitir a entrada e a conseqüente absorção de substâncias inespecíficas. Soluções alcalinas não devem ser estocadas em frascos de vidro por muito tempo, pois estes frascos são lentamente dissolvidos e íons de metais pesados são, posteriormente, encontrados nessas soluções.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

As diferentes amostras de poliovírus podem ser diferenciadas intratipicamente através do teste de hibridização por "dot blot", com sondas genéticas específicas. Durante o teste a sonda reconhece a sequência complementar presente no RNA viral, e então ocorrerá a hibridização das cadeias complementares. O conjunto de sondas genéticas utilizadas consiste de (1) uma sonda para identificar os vírus pertencentes ao grupo enterovírus e, (2) um conjunto de três sondas para reconhecer os poliovírus tipos 1, 2 e 3 de Sabin. A sonda do grupo enterovírus confirmará a presença de um enterovírus (incluindo os poliovírus) e fornecerá uma medida semi-quantitativa do RNA presente. Cada sonda específica para os vírus vacinais irá reconhecer os vírus relacionados com cada uma das três amostras de poliovírus originários da vacina. Os resultados da hibridização são evidenciados por autoradiografia.

5.2 Procedimento

Durante a realização deste ensaio devem ser obedecidas as instruções descritas na Norma CNEN-NE-3.01 - Diretrizes básicas de radioproteção. Todos os cuidados de segurança devem ser tomados quanto ao manuseio do material radioativo. Materiais como: placa protetora de acrílico, luvas, óculos de segurança, solução descontaminante de radioatividade, contador Geiger e outros são de uso obrigatório.

5.2.1 Extração do RNA (ácido ribonuclêico) viral

5.2.1.1 Com o auxílio de um pipetador automático, transferir 0,7 mL de cada amostra de poliovírus para um tubo de microcentrífuga (Eppendorf) com capacidade para 1,5 mL.

Nota: O mesmo procedimento deverá ser efetuado para as amostras-padrões (controles: Sabin e selvagem), durante todas as etapas do teste.

5.2.1.2 Centrifugar os tubos a velocidade de 12 000 rpm, durante 1 minuto.

5.2.1.3 Transferir cada sobrenadante para novo tubo de microcentrífuga e adicionar 300 µL da solução tampão 55C20x e 200 µL de formaldeído a 40%.

5.2.1.4 Homogeneizar a mistura de cada tubo vigorosamente e incubá-los em banho-maria a 60°C, durante 15 minutos.

5.2.2 Imobilização do RNA na membrana filtrante

5.2.2.1 Antes da inoculação dos RNAs das amostras em teste e dos con

troles, preparar o material a ser utilizado da seguinte maneira:

- a) lavar durante 5 minutos o papel de filtro e a membrana de nitrocelulose com água destilada e posteriormente 5 minutos em solução tampão de 55C10x;
- b) preparar o sistema "Manifold", ligando-o a uma bomba de vácuo;
- c) tirar a parte superior do "Manifold" e colocar o papel de filtro e a membrana sobre ele;
- d) cortar a membrana do lado esquerdo para marcar o início das aplicações;
- e) colocar a parte superior do sistema e fixá-lo com as garras apropriadas, em sentidos opostos, procurando tirar o ar e não danificar a membrana.

5.2.2.2 Inocular 400 μ L do RNA de cada amostra de poliovírus e dos respectivos controles em dois orifícios não seqüenciais do sistema, evitando usar os orifícios laterais. A inoculação dos orifícios deve ser realizada de tal maneira que um deles receba a sonda específica para o grupo enterovírus e o outro receba a sonda específica para o poliovírus vacinal.

5.2.2.3 Ligar a bomba de vácuo e proceder a filtração das amostras.

5.2.2.4 Após a filtração total dos volumes inoculados, desligar a bomba, retirar a membrana e colocá-la sobre um papel de filtro, deixando-a secar a temperatura ambiente, durante uma hora.

5.2.3 Pré-hibridização

5.2.3.1 Após a secagem da membrana de nitrocelulose, contendo os RNAs das amostras virais, dividir a membrana ao meio com auxílio de pinça e tesoura.

5.2.3.2 Cortar as tiras onde foram aplicadas as amostras e colocar cada uma delas dentro de um saco plástico pequeno e não tóxico.

5.2.3.3 Selar os sacos plásticos, deixando um pequeno orifício.

5.2.3.4 Inocular, através do orifício, solução tampão de hibridização em volume correspondente a 1:10 da área de cada tira de membrana.

5.2.3.5 Selar completamente os sacos plásticos e incubá-los a 37°C com agitação, durante 2 horas.

5.2.4 Hibridização

5.2.4.1 Após o período de incubação, preparar as sondas específicas (de grupo e vacinal) marcadas com (γ^{32} P) ATP (item 4.2.2.10).

5.2.4.2 Efetuar um pequeno orifício em uma das arestas dos sacos plásticos e inocular em um deles a sonda específica para o grupo enterovírus e no outro, a sonda específica para o poliovírus vacinal.

5.2.4.3 Selar os sacos plásticos e incubá-los a 37°C com agitação, durante 24 horas.

5.2.4.4 Após o período de incubação, decantar a solução tampão de hibridização em recipiente adequado para material radioativo e retirar as tiras dos sacos plásticos.

5.2.4.5 Lavar cada tira com solução tampão de lavagem SSC 2x + 0,1% de SDS, a 37°C com agitação e colocá-las para secar ao ar, sobre um papel de filtro.

5.2.5 Detecção da hibridização (autoradiografia)

5.2.5.1 Montar as tiras da membrana sobre um papel de filtro, cobri-las com papel de textura fina e, em ambiente escuro, colocá-las em um cassete com filme de Raio X Médico e o respectivo intensificador.

5.2.5.2 Fechar o cassete, assim montado, e incubá-lo em freezer a -70°C, durante 1 a 4 horas.

5.2.5.3 Após esse período, retirar o cassete do freezer e em ambiente escuro proceder a revelação do filme com as soluções apropriadas, como descrito a seguir:

- a) em uma cuba contendo o revelador, colocar o filme de Raio X durante 5 minutos mantendo-o sob leve agitação.
- b) retirar o filme e lavar em água corrente.
- c) colocar o filme durante 5 minutos em uma cuba que contém o fixador mantendo-o sob leve agitação.
- d) retirar o filme e deixar secar no ambiente.
- e) realizar a leitura do teste.

6 RESULTADOS

O resultado do teste é obtido através da observação da chapa fotográfica. O desenvolvimento de pontos circulares escuros, na chapa fotográfica, correspondente à área do orifício onde a amostra de poliovírus foi filtrada, indica que o RNA viral foi hibridizado pela sonda usada na reação. A ausência de pontos escuros indica reação negativa, isto é, não houve hibridização.

ANEXO A - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARESA-1 Ensaio de controleA-1.1 Teste de esterilidade

Após terem sido preparados, e antes de serem usados, quaisquer soluções ou meios de cultura são rotineiramente testados, quanto à presença de fungos e/ou bactérias. Este teste consiste na inoculação de 1 mL do volume de cada frasco da solução em teste em 2 tubos de caldo de soja e triptona os quais após semeadura são incubados a 35°C durante o mínimo de 48 horas (deve-se efetuar leituras diárias até completar 14 dias). Constitui evidência da presença de microrganismos qualquer turvação do caldo triptona-soja.

Essa contaminação pode ser decorrente de falhas no processo de esterilização ou contaminação após a esterilização. Além disso, os frascos contendo as soluções ou meios de cultura permanecem por 14 dias à temperatura ambiente ao abrigo da luz, como teste adicional de esterilidade, antes de serem armazenadas em refrigerador (2 a 8°C).

A-1.2 Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular

Ver Norma CETESB M1.002.

A-1.3 Controle de qualidade dos meios de cultura

Ver Norma CETESB L5.216.

A-1.4 Controle da qualidade da água destilada

A água destilada, a ser empregada em laboratórios de virologia, deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de testes específicos (ver Norma CETESB L5.215 - Prova de adequabilidade da água destilada para fins microbiológicos).

A-1.5 Controle da adequabilidade biológica da água bidestilada

Devem ser efetuados testes de adequabilidade biológica da água bidestilada para garantir a produção de uma água de alta qualidade livre de substâncias tóxicas ou nutrientes que possam interferir nos ensaios virológicos (ver Norma CETESB L5.215).

A-1.6 Armazenamento da água bidestilada

A água bidestilada deve ser armazenada em frascos limpos de vidro neutro, de preferência ao abrigo da luz e protegidos de pó ou vapores que possam ser produzidos no laboratório. O armazenamento prolongado da

água bidestilada deve ser evitado.

A-1.7 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-os entre os frascos ou os materiais a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria, a 55°C durante 24-48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente pois houve desenvolvimento de bactérias.

A-1.8 Controle de esterilidade de vidraria e materiais

É recomendável a realização de testes específicos para avaliar e comprovar a esterilidade de vidraria e materiais submetidos à esterilização em estufa a 170-180°C, ou em autoclave a 121°C. Para a realização deste teste, ver Norma CETESB L5.010 - Avaliação de laboratórios de análises microbiológicas de água.

A-2 Local de trabalho

A-2.1 As capelas de segurança biológica devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido livres de poeiras, não deve haver movimentação excessiva do ar devido ao uso de ventiladores, exaustores, etc., conversa desnecessária deve ser evitada.

A-2.2 A limpeza da sala é feita após expediente diária sem varreções exageradas e, de preferência, empregando solução de formalina ou de outro desinfetante. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente. No fim da semana realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive do teto e da parede. Após a limpeza, o ambiente é impregnado com formol, que é colocado em placas de Petri, para evaporar.

A-2.3 Se a capela estiver instalada em local com ar condicionado, a entrada de ar não deve ser dirigida diretamente sobre o campo de trabalho, a não ser que o condicionador tenha um filtro de ar especial.

A-3 Precauções

Dentre as pessoas que trabalham no laboratório, aquelas que tem menor tempo de treinamento e as que estão mais diretamente associadas à manobras com material infectado são as que apresentam maiores possibilidades de serem infectadas acidentalmente.

A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas através de pipetas, acidentes de centrifugação, etc., provocam, comprovadamente, grande número de infecções acidentais e devem ser prevenidas pelo uso de máscaras descartáveis de papel, pipetadores e pela obediência

às instruções específicas de trabalho e de uso do equipamento (ver Norma CETESB L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia).

A-3.1 Material de segurança

A-3.1.1 Aventais de plástico

Devem ser de plástico resistente e de comprimento adequado para a proteção do técnico durante os processos de lavagem.

A-3.1.2 Aventais de tecido

Para uso obrigatório por todos os técnicos na execução de quaisquer atividades laboratoriais. Antes do encaminhamento para lavagem, os aventais devem ser esterilizados em autoclave a 121°C durante 30 minutos.

A-3.1.3 Luvas de amianto

A-3.1.4 Protetor facial

De utilização obrigatória (juntamente com máscara, com filtro adequado e luvas) no preparo de solução de ácidos a serem empregados na lavagem de materiais.

/ANEXO B

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 ALEXANDER, L.M. The application of molecular virology to the detection of pathogenic viruses in water. Medmenhan, U.K., WRC, 1988 (Interim report, No.1).
- B-2 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Detection of enteric viruses. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1989, p. 155-183.
- B-3 BERG, G.; BODILY, H.L.; LENNETTE, E.H.; MELNICK, J.L; METCALF, T.G. Viruses in water. Washington, American Public Health Association, 1976. 256p.
- B-4 CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Molecular methods for the characterization of polioviruses. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia, 1991.
- B-5 _____. Radiation safety manual. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia, 1985. (HHS pub. nº 86-8398).
- B-6 CETESB - Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular. São Paulo, 1985. 1ª revisão, (Norma Técnica M1.002).
- B-7 _____. Identificação de enterovírus. São Paulo, 1985. 1ª revisão, (Norma Técnica L5.504).
- B-8 _____. Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia. São Paulo, 1986. 1ª revisão (Norma Técnica L5.009).
- B-9 _____. Prova de adequabilidade biológica da água destilada para fins microbiológicos. São Paulo, 1985. 1ª revisão (Norma Técnica L5.215).
- B-10 CNEN. Diretrizes básicas de radioproteção. São Paulo, CNEN, 1988. 129p. (CNEN-NE-3.01).
- B-11 COSTA, C.A.R.; FUKUMORI, D.T.; ELORZA, J.H.; SANCHES, M. P. & BELLINTANI, S.A. Noções básicas de radioproteção. São Paulo, CNEN, 1986. 56p.
- B-12 FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D.J.; GARELICK, H.; MARA, D.D. Sanitation and disease health aspects of excreta and wastewater management. New York, John Wiley, 1983. p. 133-172.
- B-13 GERBA, C.P.; MARGOLIN, A.B.; HEWLETT, M.J. Application of gene probe to virus detection in water. Water Sci. Technol., 21: 147-154, 1989.

- B-14 IAWPRC STUDY GROUP ON WATER VIROLOGY. The health significance of viruses in water. Water Res., 17: 121-132, 1983.
- B-15 KEW, O.M.; GEORGE, R.; NOTTAY, B.K. Techniques manual for DNA probe technology. Application to the identification of poliovirus isolates. Atlanta, Centers for Disease Control. Pan American Health Organization, 1987. p.1-19.
- B-16 KEW, O.M.; NOTTAY, B.K.; RICO-HESSE, R.; PALLANSCH, M.A. Molecular epidemiology of wild poliovirus transmission. Appl. virol. Res., 2, 1990 (no prelo)
- B-17 LENNETTE, E.H.; SCHMIDT, N.J. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th Edition, APHA, 1979. p. 471-534.
- B-18 MARQUES, E. Utilização de análises virológicas de águas de esgoto no acompanhamento de programas de vacinação contra a poliomete para avaliar a circulação de poliovírus selvagem no meio ambiente. São Paulo, 1990. 147 p. (Dissertação de doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Univ. de São Paulo).
- B-19 METCALF, T.G.; JIANG, X.; ESTES, M.K.; MELNICK, J.L. Nucleic acid probes and molecular hybridization for detection of viruses in environmental samples. Prog. Med. Virol., 35: 186-214, 1988.
- B-20 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor, 1989.
- B-21 SILVA, E.E.; PALLANSCH, M.A.; HOLLOWAY, B.P.; SCHATZMAYR, H.G.; KEW, O.M. Design of synthetic probes for the detection of polio virus strains isolated in Brazil. Intervirol., 1900b (no prelo).
-