

1. INTRODUÇÃO

Nos finais dos anos 90 a Técnica Amplificação de Ácido Nucléico¹ (NAT) tornou-se comum nos laboratórios de biologia molecular, constituindo-se então em um passo essencial para a segurança transfusional.

A Portaria nº262/2002 do Ministério da Saúde, de 05 de fevereiro de 2002, tornou obrigatório a inclusão dos testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos NAT, em todas as amostras de sangue de doador. Com a implantação do NAT diminui-se o “risco de transmissão dos vírus da Hepatite C HCV² e do Vírus da Imunodeficiência Humana HIV³, por transfusões de hemocomponentes, aumentando a segurança transfusional” (Ministério da Saúde, 2002). A partir daquela data, os testes são obrigatórios, no âmbito da Hemorrede Nacional, em todos os serviços de hemoterapia públicos, filantrópicos e/ou privados contratados pelo SUS, e privados.

Alguns hemocentros, a exemplo do da Bahia, não possuem estrutura física adequada para implantação da técnica. O Hemoba estima a realização de 1.000 testes por dia⁴, que deverão ser realizados em um laboratório especialmente construído para tal finalidade.

O que esse trabalho pretende é “clarear idéias”, estabelecer critérios para a elaboração do projeto do laboratório. É o esboço de um estudo a ser aprofundado.

1 NAT Nucleic Acid Amplification Test

2 HCV é um vírus que infecta o fígado e resulta na doença de fígado, na falha do fígado e na morte. Mais comum e mais infeccioso do que HIV-1, o vírus HCV afeta cerca de 170 milhões de pessoas no mundo. O HCV é transmitido de indivíduo a indivíduo através dos líquidos de corpo, particularmente do sangue e dos produtos do sangue.

3 O HIV é o retrovírus que causa a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS). A AIDS foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1982. E desde o início da epidemia, a faixa etária mais atingida tem sido a de adultos entre 20 a 39 anos de idade. O último Boletim Epidemiológico da Aids, publicação trimestral do Ministério da Saúde, já registrou 179.541 casos de Aids desde 1980. Deste total, 4.077 são entre adolescentes na faixa etária dos 13 aos 19 anos.

4Fonte: Hemoba.

2. O QUE É O NAT?

Um sangue seguro é aspiração de médicos e doentes. Durante os anos 80 e 90 se conseguiu uma segurança, então considerada máxima, para os vírus HBV (Hepatite B), HCV (Hepatite C) e HIV (Imunodeficiência Humana Adquirida), eliminando os doadores de sangue com anticorpos contra qualquer desses vírus. No entanto, o período de soroconversão de 22 dias para o HIV e de 50 a 60 dias para o HCV, em que há viremia sem anticorpos, conhecida como “fase da janela imunológica”, constituiu um obstáculo importante para se poder considerar uma transfusão como isenta de riscos, embora as probabilidades de transmissão nesse período sejam raras (PINHO et al, 2000).

Nos últimos anos, tornou-se cada vez mais usual as técnicas de biologia molecular com amplificação do material genético. Na década de 90, estas técnicas começaram a ser

utilizadas na rotina para diagnóstico e acompanhamento de doentes com Hepatite por vírus B e C e, posteriormente, para HIV. Iniciou-se a prática de várias técnicas de amplificação dos ácidos nucleicos (NAT): reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos (NASBA), DNA ramificado (bdNA).

As NAT foram desenvolvidas, na área de rastreio das doações de sangue, para detecção da infecção no período que precede o desenvolvimento de anticorpos, durante a fase inicial da mesma. Devido ao elevado número de amostras que têm de ser processadas num curto período de tempo, estas provas deverão ser realizadas em “pool”. É o limiar de sensibilidade das provas e o tamanho do “pool” das amostras que irá influenciar a eficácia destas técnicas.

Para a utilização de tais práticas, é necessário admitir e formar pessoal qualificado, criar espaços e estruturas adequados, ter os equipamentos necessários e criar rotinas. Essas rotinas deverão contemplar: 1) a coleta do material e sua conservação; 2) transporte das amostras; 3) extração do DNA; 4) preparação da amostra; 5) amplificação do DNA/RNA; e, 5) armazenamento do plasma.

“Pools” são mistura de amostras, isto é, o laboratório reúne o plasma de uma certa quantidade de doadores, cujo número depende do equipamento, em um único tubo e realiza os testes NAT para HIV e HCV. Se o resultado for positivo, prepara-se uma nova mistura dos plasmas iniciais, dessa vez com uma quantidade bem menor de doadores em cada tubo, e realiza novamente o teste. O tubo que apresentar resultado positivo deve ser novamente dividido, agora em amostras individuais, e um novo teste será realizado.

3. O LABORATÓRIO

3.1. Normas Específicas

Segundo a Portaria nº1.312/MS, de 30 de novembro de 2000, o laboratório de biologia molecular, para fins de cadastramento no SUS, está classificado em Tipo II, “com capacidade instalada e técnica apta a realizar procedimentos de histocompatibilidade por meio de sorologia e biologia molecular de baixa e alta resolução”.

A mesma portaria, no item 2.3, exige que as áreas físicas dos laboratórios se enquadrem nos critérios e normas estabelecidos pela legislação em vigor . 6

3.2. Procedimentos a serem realizados

O procedimentos a seguir listados foram fornecidos pelo Hemoba, que se baseou nas informações e referências bibliográficas obtidas após pesquisa e consulta junto a algumas empresas, além da RDC nº50/2002:

- receber amostras de doadores da Fundação Hemoba e outros Serviços Hemoterápicos conveniados;
- fazer análise e procedimentos laboratoriais na amostras com finalidade de diagnóstico e pesquisa;
- fazer o preparo de reagentes/soluções;
- emitir laudo das análises realizadas, em meio eletrônico;
- Acondicionamento e pré-tratamento de resíduos gerados;

- Preparação da Plasmateca.

Para a realização da técnica NAT, a depender da marca dos equipamentos utilizados, os procedimentos de análise das amostras poderão ser diferenciados:

- a) Etapas para a marca Roche
 - preparação dos reagentes
 - preparação das amostras
 - fase de amplificação
 - fase de detecção.

⁶ É citada a Portaria GM/MS nº1.884, de 11 de novembro de 1994, atualmente substituída pela RDC nº50, de 21 de fevereiro de 2002.

- b) Etapas para a marca Chiron

- preparação dos reagentes
- preparação das amostras
- pipetagem das amostras, manual ou automatizada
- fase de pré-amplificação
- fase de amplificação
- ensaio de proteção da hibridação (detecção),
constando de hibridação, seleção e detecção.

3.3. Definição do Laboratório

Um laboratório para execução do NAT, deve-se dispor de áreas e espaços laboratoriais bem delimitados para as diferentes etapas de execução, desde a preparação de amostras até a fase de detecção do produto amplificado. Da sua adequada concepção depende a confiabilidade dos resultados e a prevenção de contaminações.

Segundo RDC nº50/2002, o Laboratório de Biologia Molecular é classificado no Nível de Biossegurança 2 (NB-2), adequado para “qualquer trabalho que envolva sangue humano, líquidos corporais, tecidos ou linhas de células humanas primária onde a presença de um agente infeccioso pode ser desconhecido”. De acordo com a citada Resolução, os procedimentos que envolvem um alto potencial para produção de salpicos ou aerossóis que possam aumentar os riscos de exposição dos funcionários, devem ser conduzidos com um equipamento de contenção primária ou com dispositivos como a Cabine de Segurança Biológica ou os copos de segurança da centrífuga, além da utilização de barreiras primárias, como os escudos para borrifos, proteção facial, aventais e luvas.

“As barreiras secundárias como pias para higienização das mãos e instalações para descontaminação de lixo devem existir com o objetivo de reduzir a contaminação potencial do meio ambiente”. (Ministério da Saúde, 2002)

Obrigatoriamente um Laboratório de Biologia Molecular deve-se dispor das seguintes áreas:

3.3.1. Área para Separação das Amostras

A depender da metodologia utilizada, poderá compreender: área de centrifugação, área de separação, área de “pooling” (com necessidade de pipetador automático).

3.3.2. Área de Preparação (Pré-amplificação)

As áreas de preparação de amostras e reagentes poderão estar localizadas no mesmo laboratório, desde que sejam respeitados os espaços definidos para cada uma delas. No caso de utilização de “pools”, estes espaços deverão manter-se separados.

— **De Amostras:** área de extração dos ácidos nucléicos e adição do DNA à reação de PCR ⁷, utilizando equipamento automático ou técnica manual através de Câmara de Segurança Biológica Nível 2 com Ultravioleta. A área de preparo de amostras deve ser mantida limpa, com uso de reagentes químicos (p. ex., HCl 1N) e/ou ultravioleta (UV). Recomenda-se restrição de tráfego de pessoas e utilização de aventais exclusivos.

— **De Reagentes:** área destinada à preparação da mistura de amplificação e/ou outros reagentes (pré-mix) necessários. Na área de preparo de reagentes recomenda-se: o uso de fluxo laminar com luz ultravioleta e nível de biossegurança 2, congelador próprio para as soluções, restrição de tráfego de pessoas e utilização de aventais exclusivos.

3.3.3. Área de Amplificação e Detecção

— Deverá ser instalada em outro laboratório, completamente separado das áreas anteriores, a fim de serem evitadas contaminações. A área de amplificação deve-se utilizar também procedimentos químicos (p. ex., HCl 1N) e/ou ultravioleta (UV), para inativar produtos amplificados. O termociclador pode ser mantido nesta área, ou numa outra separada.

⁷ PCR (Polymerase Chain Reaction) A Reação em Cadeia da Polimerase é uma técnica que amplifica o número de moléculas de DNA em uma amostra, possibilitando a detecção, com alta especificidade, de concentrações extremamente baixas de um determinado organismo.

3.3.4. Laboratório de Contingência

Deverá existir um laboratório totalmente montado e equipado, que poderá ser utilizado em caso de interdição da área de pré-amplificação, já que o processo não pode ser interrompido.

3.4. Quadro de Pessoal

Esta área deve dispor de pessoal especificamente qualificado, em quantidade compatível com o número de diversidade de amostras analisadas. Segundo orientação do Hemoba, a equipe técnica mínima por turno, para análise de 1.000 amostras/dia, deverá constar de: 01 (um) Supervisor, 01 (um) Bioquímico e 03 (três) técnicos, 01 (um) Funcionário para Recepção, além de 01 (um) Responsável Técnico.

3.5. Recomendações Gerais

Todas as portas devem ser dimensionadas de forma a permitir a passagem dos equipamentos.

— As salas deverão ser providas de lavatórios para mãos e bancadas inox com cuba

para trabalho.

— Nenhum material de acabamento e de revestimento será poroso e todos deverão permitir a limpeza com hipoclorito de sódio, inclusive piso, parede e teto.

— As bancadas deverão ter dimensões que permitam a instalação dos equipamentos.

— Temperatura ambiente adequada para a realização de testes que exigem temperaturas de 22°C, permanentemente monitorada para assegurar que está dentro da faixa aceitável;

— Não deve haver comunicação entre a Sala de Amplificação e a de Detecção.

— No caso de utilização de sistema de ar condicionado central, não deverá haver comunicação entre a sala de pré e a de pós amplificação, nem circulação de ar entre as mesmas.

— Para o preparo de meios e soluções é necessária a utilização de água purificada, cerca de 10ml por dia.

— Utilizar lâmpadas ultravioleta a cada 2,00m, nas salas de trabalho.

— Rede elétrica estabilizada 110V (5%) e 230V (5%), com garantia de suprimento contínuo de energia.

— Sistema de interfaciamento.

— As lâmpadas deverão possuir proteção acrílica.

— O armazenamento, manipulação e dejetos de materiais orgânicos e radioativos devem obedecer às normas vigentes.

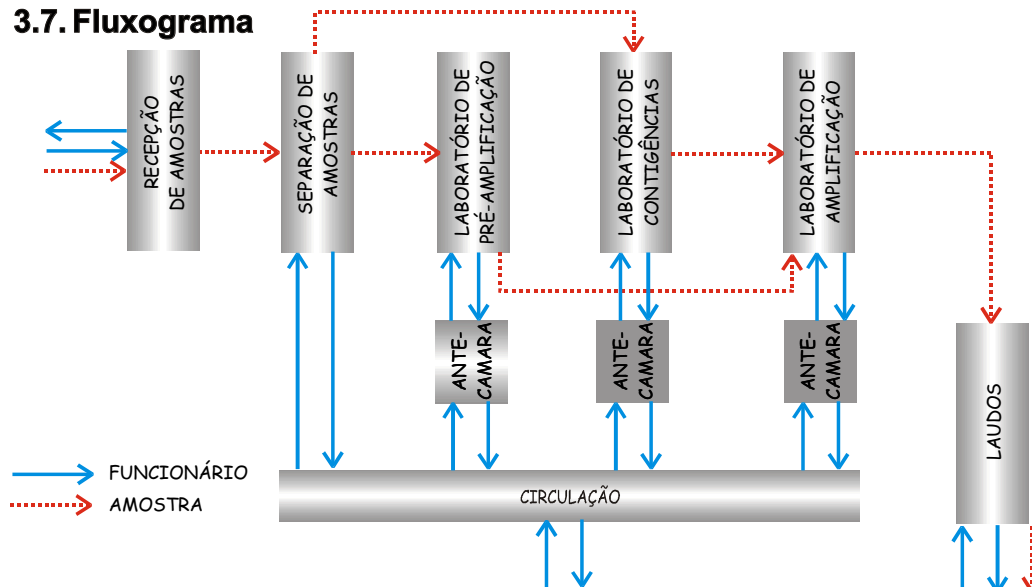
3.6. Programa e Pré-dimensionamento

Recepção de Amostras	6,00m ²
Depósito de Material	6,00m ²
Sanitário Feminino	4,00m ²
Sanitário Masculino	4,00m ²
Depósito Temporário de Resíduos com Autoclave	6,00m ²
D.M.L.	2,00m ²
Sala Administrativa	8,00m ²
Sala de Laudos	6,00m ²
Sala de Separação de Amostras	9,00m ²
Laboratório de Pré-amplificação com antecâmara	20,00m ²
Extração de ácidos nucleicos	
Preparação de amostras e reagentes	
Estoque temporário de DNA	
Plasmateca	6,00m ²
Sala de estoque de reagentes e materiais descartáveis	6,00m ²
Sala de amplificação com antecâmara	20,00m ²
Laboratório de Contingências com antecâmara	20,00m ²

Total

123,00m²

3.7. Fluxograma



3.8. Equipamentos

Para cada área existem os equipamentos específicos, que serão relacionados nas tabelas abaixo. A quantidade de equipamentos será determinada em função do número de amostras a serem analisadas pelo laboratório.

3.8.1. Área de separação de amostras:

EQUIPAMENTO	DIMENSÕES (cm)		
	Alt.	Larg.*	Prof.
Geladeira Doméstica	164	66	68
Centrífuga Refrigerada	35	67	58
Micro-Computador	60	50	70

3.8.2. Área de Extração de DNA:

EQUIPAMENTO	DIMENSÕES (cm)		
	Alt.	Larg.	Prof.
Agitador Eletrônico Vortex	15	15	25
Banho-maria	36	60	42
Centrífuga Refrigerada	35	67	58
Micro-Computador	60	50	70
Fluxo laminar com UV	195	109	75
Freezer (-18°C)	164	66	68
Geladeira Doméstica	164	66	68
Microcentrífuga	34	29	50
Pipetador Automático	58	150	73

3.8.3. Área de preparo de amostras:

EQUIPAMENTO	DIMENSÕES (cm)		
	Alt.	Larg.	Prof.
Agitador Eletrônico Vortex	15	15	25
Banho-maria	36	60	42
Micro-Computador	60	50	70
Fluxo laminar com UV	195	109	75
Freezer (-18°C)	164	66	68
Geladeira Doméstica	164	66	68
Pipetador Automático	58	150	73
Termociclador PCR	45	60	60

3.8.4. Área de Preparo de Reagentes:

EQUIPAMENTO	DIMENSÕES (cm)		
	Alt.	Larg.	Prof.
Agitador Eletrônico Vortex	15	15	25
Fluxo laminar com UV	195	109	75
Freezer (-18°C)	164	66	68

3.8.5. Área de Amplificação

EQUIPAMENTO	DIMENSÕES (cm)		
	Alt.	Larg.	Prof.
Agitador Eletrônico Vortex	15	15	25
Banho-maria	36	60	42
Micro-Computador	60	50	70
Freezer (-18°C)	164	66	68
Luminômetro	29	60	50
Impressora	40	50	40
Cobas Amplicor	80	100	70
Geladeira Doméstica	164	66	68

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a projeção de um laboratório de biologia molecular, o arquiteto deverá levar em conta o número de amostras a serem analisadas e o tipo de técnica a ser utilizada. Consequentemente, poderá obter a relação de equipamentos e número de funcionários, elaborar pré-dimensionamentos, fluxogramas e, finalmente, o leiaute do laboratório. Com uma metodologia de projeto correta, a possibilidade de erro na idealização dos espaços torna-se remota, o que no caso de uma laboratório de biologia molecular, resultará em fluxos que serão orientadores dos procedimentos.

5. BIBLIOGRAFIA

BRANDÃO, A.; FUCHS, S.; SILVA, M.; EMER, L. **Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura**. Disponível em: <http://www.paho.org/portuguese/DBI/es/06-Brandao.pdf>. Acesso em jul. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Departamento de Normas Técnicas. **Resolução RDC nº50, de 21 de fevereiro de 2002**. Dispõe sobre o regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. Brasília, 2002. Disponível em

http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/50_02rdc.pdf. Acesso em: mar.2002.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria nº1.313, de 30 de novembro de 2000**.

Determina os laboratórios que poderão ser cadastrados para realização dos exames de Histocompatibilidade relacionados na Portaria GM/MS nº1.314, de 30 de novembro de 2000. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acesso em: abr. 2002.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria nº262, de 5 de fevereiro de 2002**. Torna obrigatório, no âmbito da Hemorrede Nacional a inclusão nos Serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos e/ou privados contratados pelo SUS, e privados, os testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos - NAT, para HIV

e HCV, em todas as amostras de sangue de doadores. Disponível em: <http://www.abto.com.br/legislacao/por262.htm>. Acesso em: mar. 2002. _____ . Ministério da Saúde. **Portaria nº1.312, de 30 de novembro de 2000**. Normas de Cadastramento dos Laboratórios de Histocompatibilidade, no âmbito do Sistema Único de Saúde SUS. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acesso em: abr. 2002.

CAMACHO, R.; ARAÚJO, F.; SARGENTO, C.; QUEIRÓS, L.; PEREIRA, J.

Utilização de técnicas de ácidos nucleicos no rastreio das colheitas de sangue.

Disponível em: <http://www.ipsangue.org/ABOn2.pdf>. Acesso em jul.2002.

CBS. **Nucleic Acid Amplification Testing for HIV**. Disponível em:

[http://www.bloodservices.ca/CentreApps/Internet/UW_V502_MainEngine.nsf/resources/PDF/\\$file/scientific_document.pdf](http://www.bloodservices.ca/CentreApps/Internet/UW_V502_MainEngine.nsf/resources/PDF/$file/scientific_document.pdf). Acesso em jul.2002.

PINHO, L; DIAS, F.; MONTEIRO, R. JUSTIÇA, B. **O uso de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos no rastreio do HCV e do HIV nas dádivas de sangue. Experiência do Hospital geral de Santo António**. Disponível em:

<http://www.ipsangue.org/artigo1n3.pdf>. Acesso em jul.2002.

ROCHE. **COBAS AmpliScreen PCR. O NAT da Roche Diagnostics para Triagem de HIV e HCV em Bancos de Sangue**. Em xerox. Jun. 2002.

VERLÊNCIA, Rosângela, BASSIT, Leda. **Riscos da Técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) in house para detecção de agentes infecciosos**. Disponível em: http://www.roche.com.br/diagnostica/lab_system/web/artigos_amplicor3.asp. Acesso em: jun. 2002.