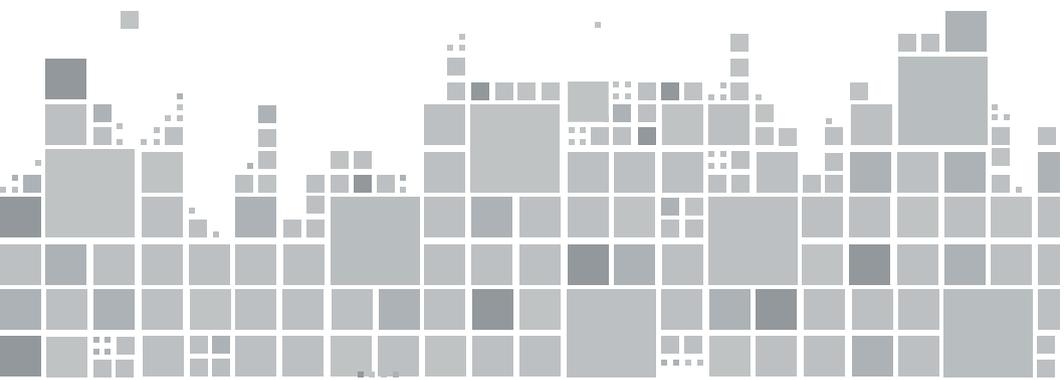


Guia de Boas Práticas e Procedimentos Operacionais Padrão para o diagnóstico da COVID-19



Série Livro-Texto

Autores:

Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque, doutora em Inovação Terapêutica pela UFPE

Anderson Rodrigues de Almeida, mestre em Inovação Terapêutica pela UFPE

Eduardo Davi Lima da Silva, mestre em Inovação Terapêutica pela UFPE

Eraldo Fonseca dos Santos Júnior, doutor em Biologia Aplicada a Saúde pela UFPE

Eudes Gustavo Constantino Cunha, mestre em Inovação Terapêutica pela UFPE

José Luis Ferreira de Sá, doutor em Bioquímica e Fisiologia pela UFPE

Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho, mestre em Inovação Terapêutica pela UFPE

Lília Vieira Galdino, mestre em Inovação Terapêutica pela UFPE

Maíra Galdino da Rocha Pitta, professora do departamento de Bioquímica da UFPE

Maria Andrezza Bezerra Correia doutora em Ciências Biológicas da UFPE

Michelle Melgarejo da Rosa, professora do departamento de Bioquímica da UFPE

Michelly Cristiny Pereira, professora do departamento de Farmacologia e Fisiologia da UFPE

Moacyr Jesus de Melo Rego, professor do departamento de Bioquímica da UFPE

Priscilla Stela Santana de Oliveira, doutora em Inovação Terapêutica pela UFPE

Rômulo Pessoa e Silva, doutor em Biotecnologia em Saúde - BBS/FIOCRUZ

Sayonara Maria Calado Gonçalves, doutora em Inovação Terapêutica pela UFPE

Valécia de Cassia Mendonça da Costa, mestre em Inovação Terapêutica pela UFPE

Vanessa Mylenna Florêncio de Carvalho, mestre em Inovação Terapêutica pela UFPE

Recife
2021



Universidade Federal de Pernambuco

Reitor: Alfredo Macedo Gomes

Vice-Reitor: Moacyr Cunha de Araújo Filho

EDITORA ASSOCIADA À



Pró-Reitoria de Graduação

Pró-Reitora: Magna do Carmo Silva

Diretora: Fernanda Maria Ribeiro de Alencar

Editores UFPE

Diretor: Junot Cornélio Matos

Vice-Diretor: Diogo Cesar Fernandes

Editor: Artur Almeida de Ataíde

Comitê de avaliação

Adriana Soares de Moura Carneiro, Ana Célia Oliveira dos Santos, Andressa Suely Saturnino de Oliveira, Arquimedes José de Araújo Paschoal, Assis Leão da Silva, Ayalla Camila Bezerra dos Santos, Chiara Natercia Franca Araujo, Deyvylan Araujo Reis, Djailton Cunha, Flavio Santiago, Hyana Kamila Ferreira de Oliveira, Isabel Cristina Pereira de Oliveira, Jaqueline Moura da Silva, Jorge Correia Neto, Keyla Brandão Costa, Luciana Pimentel Fernandes de Melo, Márcia Lopes Reis, Márcio Campos Oliveira, Márcio Vilar França Lima, Maria Aparecida Silva Furtado, Maria da Conceição Andrade, Michela Caroline Macêdo, Rodrigo Gayger Amaro, Rosa Maria Oliveira Teixeira de Vasconcelos, Shirleide Pereira da Silva Cruz, Tânia Valéria de Oliveira Custódio, Waldireny Caldas Rocha

Editoração

Revisão de texto: Renata Virgínia Cavalcanti Santos

Projeto gráfico: Diogo Cesar Fernandes | Gabriel Santana

Diagramação: João Dionísio

Catálogo na fonte

Bibliotecária Kalina Ligia França da Silva, CRB4-1408

G943 Guia de boas práticas e procedimentos operacionais padrão para o diagnóstico da COVID-19 [recurso eletrônico] / Amanda Albuquerque de Barros Pinheiro... [et al.]. – Recife : Ed. UFPE, 2021. (Série Livro-Texto)

Vários autores.
Inclui referências.
ISBN 978-65-5962-087-6 (online)

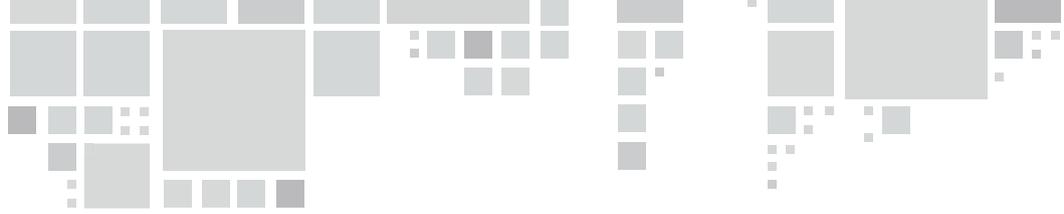
1. COVID-19 (Doença) – Diagnóstico – Manuais, guias, etc. 2. COVID-19 (Doença) – Prevenção – Manuais, guias, etc. 3. Laboratórios – Medidas de segurança – Manuais, guias, etc. 4. Diagnóstico de laboratório – Manuais, guias, etc. 5. Biossegurança. I. Pinheiro, Amanda Albuquerque de Barros. II. Título da série.

614.4 CDD (23.ed.)

UFPE (BC2022-027)

Esta obra está licenciada sob uma Licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional.





SÉRIE LIVRO-TEXTO

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pautada pelos princípios da democracia, da transparência, da qualidade e do compromisso social, assume a Educação Superior como um bem público e um direito de todas e todos. Nesse sentido, estimula a melhoria das condições do trabalho docente, a inserção de metodologias de ensino inovadoras e a articulação dos conhecimentos teóricos e práticos nas diferentes áreas do saber como instrumentos de promoção de uma formação científica, humanística e artística que prepare nossos estudantes para a intervenção na realidade, segundo o compromisso com o desenvolvimento integral e sustentável, a equidade e a justiça social. Assim, a UFPE, por intermédio da Pró-Reitoria de Graduação e da Editora UFPE, oferta à comunidade acadêmica e à sociedade mais uma seleção da Série Livro-Texto, com o objetivo de contribuir para a formação da biblioteca básica do estudante de graduação e para a divulgação do conhecimento produzido pelos docentes desta Universidade. Os 34 livros selecionados para esta coleção, que contemplam diferentes áreas do saber, foram aprovados segundo as condições estabelecidas no Edital 14/2021 (Edital simplificado de incentivo à produção e publicação de livros digitais Prograd/ Editora UFPE) e representam o esforço de discentes (de graduação e pós-graduação) e servidores (docentes e técnicos) e da gestão da Universidade em prol da produção, sistematização e divulgação do conhecimento, um de seus principais objetivos.

Alfredo Macedo Gomes – Reitor da UFPE

Moacyr Cunha Araújo Filho – Vice-Reitor da UFPE

Magna do Carmo Silva – Pró-Reitora de Graduação (Prograd)

Fernanda Maria Ribeiro de Alencar – Diretora da Prograd



PREFÁCIO

O presente guia tem por objetivo fornecer informações e medidas unificadas sobre as boas práticas laboratoriais para a realização dos testes de diagnóstico para pacientes com suspeita da Doença do Coronavírus de 2019 (COVID-19), de acordo com as normas de biossegurança preconizadas pela Organização Mundial de Saúde, Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ademais, contém procedimentos operacionais padrão voltados para o diagnóstico da COVID-19 utilizando a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) e foi organizado em 10 capítulos.

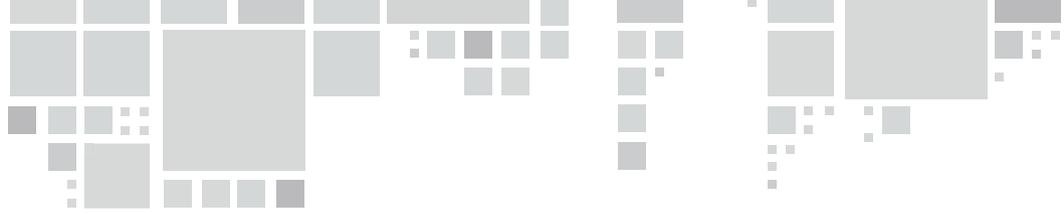
Este guia contempla as regras de biossegurança já estabelecidas em manuais, resoluções, normas e instruções normativas.

Este material pode não cobrir todos os aspectos relacionados à segurança. Caso uma prática perigosa não seja mencionada, a omissão não pode ser usada como justificativa para isentar de responsabilidade os indivíduos que a executam.

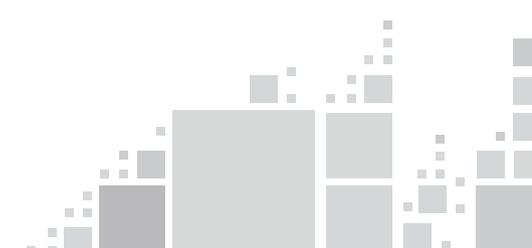
Qualquer dúvida referente ao conteúdo deste guia pode ser esclarecida junto à Equipe Técnica e Gestora do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
COVID-19	<i>CoronaVirus Disease - 2019</i>
CSB	Cabine de Segurança Biológica
CsCl	Cloreto de Césio
CT	<i>Cycle Threshold</i>
EPC	Equipamento de Proteção Coletiva
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FADE	Fundação de Apoio ao Desenvolvimento
GAL	Gerenciamento de Ambiente Laboratorial
HSC	<i>Human Specimen Control</i>
IE	Instruções de Equipamento
IT	Instruções de Trabalho
LACEN-PE	Laboratório Central de Pernambuco
MS	Ministério da Saúde
NB	Nível de Biossegurança
NUPIT-SG	Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
POP	Protocolo Operacional Padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RP	RNAse P
RPELAB	Rede Pernambucana de Laboratórios
RT-qPCR	Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
SCQ	Sistema de Controle de Qualidade
TNT	Tecido não tecido
UV	Ultravioleta
VTM	<i>Viral Transport Media</i>



SUMÁRIO

1. ORIENTAÇÕES SOBRE EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL 8
 2. HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS 26
 3. DESCONTAMINAÇÃO DE EQUIPAMENTOS E SUPERFÍCIES E DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO 31
 4. COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRA 35
 5. RECEBIMENTO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA COVID-19 41
 6. EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL PARA O DIAGNÓSTICO DA COVID-19 47
 7. REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA – TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-qPCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA COVID-19 55
 8. EMISSÃO DOS LAUDOS: ANÁLISE, CONFERÊNCIA E RASTREABILIDADE DOS DADOS 66
 9. PLANO DE RESPOSTA A EMERGÊNCIAS/ INCIDENTES 71
 10. DIRETRIZES DO CONTROLE DA QUALIDADE PARA A EXECUÇÃO DO DIAGNÓSTICO DA COVID-19 NO NUPIT-SG 74
- 

1 ORIENTAÇÕES SOBRE EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Com a crise sanitária provocada pelo novo coronavírus SARS-COV-2, muitos ambientes de pesquisa precisaram passar por reformas para acompanhar a evolução da pandemia da COVID-19. A alta demanda por testes diagnósticos levou então a uma intensa adequação de normas de biossegurança por parte dos laboratórios (MARTINELLO, 2020).

Na atual situação da pandemia, as boas práticas de biossegurança têm sido uma ferramenta de grande relevância e amplamente destacada para a prevenção da contaminação pelos agentes infecciosos (GARDEZI; IKRAM, 2020). De acordo com o Ministério da Saúde, Biossegurança é uma ciência direcionada à prevenção, controle, redução ou eliminação de riscos de dano ou acidente relacionados às práticas em laboratório para proteção da saúde humana, animal, do meio ambiente e da qualidade dos trabalhos desenvolvidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

As boas práticas de biossegurança no laboratório são baseadas na execução do conhecimento, nas técnicas e na qualidade dos equipamentos para atenuar riscos e promover um ambiente de trabalho seguro (GARDEZI; IKRAM, 2020). As medidas de biossegurança são adotadas de acordo com a avaliação desses riscos, realizada por cada laboratório. Essa avaliação baseia-se em uma análise crítica de

todos os procedimentos do laboratório, como coleta e recebimento das amostras, testes de rotina e moleculares, descarte de amostras, entre outros, e na relação de todos os perigos atrelados a esses procedimentos (LIPPI et al., 2020).

É necessário perceber que os perigos, isoladamente, não significam risco ao indivíduo, pois só há risco quando ocorre a exposição. Por isso, os equipamentos e procedimentos aplicados devem ser observados na análise dos riscos, os quais podem aumentar ou diminuir a possibilidade de contaminação (GARDEZI; IKRAM, 2020; MOURYA et al., 2020; TAN et al., 2020)

As principais formas de controle de risco no caso da COVID-19 são: utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), medidas administrativas, como normas e sinalizações de segurança, soluções de engenharia, especificamente isolar a equipe do perigo, substituir e eliminar o perigo. Essas duas últimas não são viáveis, visto que, o “perigo” é o coronavírus (CDC, 2020).

O EPI é todo equipamento de uso individual empregado pelo trabalhador determinado à segurança do trabalho e seu uso é uma das principais formas de controle de risco de contaminação no laboratório (MARTINELLO, 2020). É importante enfatizar que esse dispositivo só é considerado EPI após a emissão de um Certificado de Aprovação pelo órgão nacional competente, para que o fabricante seja responsabilizado legalmente, caso o dispositivo venha a exibir algum defeito (MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO, 2020).

Embora os EPIs sejam classificados como um método de cuidados primários, não devem ser tomados como uma única forma para a prevenção da contaminação pelo coronavírus (SARSCoV-2) (MARTINELLO, 2020). De acordo com relatos na literatura, o manuseio adequado, treinamento para colocação e retirada, prática de higiene das mãos e comportamento humano contribuem para um bom funcionamento dos EPIs, caso contrário, pode aumentar um risco de contaminação mais do que o próprio agente biológico (GARDEZI; IKRAM, 2020; MOURYA et al., 2020).

Em situação da pandemia, o uso adequado de EPIs, a disposição dos trabalhadores, lavagem das mãos e o distanciamento social ao longo do período de trabalho ajudam a mitigar a transmissão dos agentes biológicos (LIPPI et al., 2020; MOURYA et al., 2020).

Dentre as normas de biossegurança, o método de distanciamento social em laboratório pode ajudar a diminuir a contaminação pelo coronavírus entre os trabalhadores. Esse método pode ser alcançado separando os profissionais em dois ou mais grupos, além de

implementar um sistema de escala de 12 e 36 horas de folga, com o objetivo de impedir o contato entre as equipes (MARTINELLO, 2020).

Ademais, é necessária uma orientação técnica sobre a testagem para o diagnóstico da COVID-19 e realizar testes semanais em todos os profissionais de saúde e colaboradores com o objetivo de evitar a disseminação do vírus entre os trabalhadores.

O uso de EPIs em diferentes etapas do diagnóstico da COVID-19 é de grande relevância para impedir a contaminação, por exemplo, na etapa do recebimento e processamento da amostra. Nesta seção serão abordados alguns desses dispositivos de EPIs, como óculos de proteção, protetor facial, gorro ou touca, propés, luva de procedimento, máscara N95/PPF2, avental, macacão de isolamento, macacão de proteção impermeável, calçado fechado e calça longa.

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPIs)

São utilizados para proteger os profissionais da área de saúde contra o risco de contaminação com agentes infecciosos, tóxicos ou corrosivos, calor excessivo, fogo e outros perigos. Também podem auxiliar no impedimento da contaminação do material em experimento ou em produção.

ÓCULOS DE PROTEÇÃO

O uso de óculos de proteção é preconizado para as atividades propagativas e não propagativas com amostras biológicas (Figura 1A).

Objetivo: evitar a contaminação por gotículas respiratórias e secreções e a disseminação de partículas virais. Os óculos de proteção ou de segurança também proporcionam uma barreira física contra respingos de agentes corrosivos, irritações e outras lesões oculares relacionadas à ação de produtos químicos, radiações e partículas sólidas. Eles devem proporcionar visão transparente e sem distorções.

Público-alvo: esse dispositivo é destinado para os profissionais da área de saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: esse dispositivo deve ser usado quando houver risco de exposição a respingos de sangue, secreções corporais e excreções.

Especificações: os óculos de segurança são específicos para cobrir a frente e ao lado da face. Deve ser novo ou corretamente higienizado.

Recomendações importantes: os óculos de proteção são exclusivos para cada profissional; deve ser colocado sobre os olhos e ajustados em seguida. Após o uso, deve ser limpo e desinfetado com álcool líquido a 70%, hipoclorito ou semelhantes; lave com água e sabão/detergente, caso os óculos de proteção apresentem sujeira visível. Utilize os óculos de proteção sobre os óculos de grau, caso necessite. Se as suas mãos se contaminarem durante a retirada dos óculos de proteção, lave-as imediatamente ou use álcool 70%. Remova os óculos de proteção da parte anterior da cabeça levantando o laço ou a fita elástica em torno da cabeça.

PROTETOR FACIAL

O protetor facial é um dispositivo de biossegurança também usado em caso de atividades propagativas e não propagativas com materiais biológicos e entre outros materiais nocivos (Figura 1B).

Objetivo: esse dispositivo oferece proteção para todo o rosto impedindo a contaminação por gotículas respiratórias e secreções e a disseminação de partículas virais. Também podem ser úteis contra riscos de contaminação com partículas sólidas, quentes ou frias, substâncias nocivas como poeiras, líquidos, vapores químicos, além de oferecer proteção contra radiações.

Público-alvo: esse dispositivo é destinado para os profissionais da área de saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: a utilização desse dispositivo é exigida quando houver risco de exposição a respingos de sangue, secreções corporais e excreções.

Especificações: o protetor facial é um dispositivo específico para cobrir a frente e o lado do rosto. Deve possuir dimensões mínimas de espessura 0,5 mm, largura 240 mm e altura 240mm e ser novo ou corretamente higienizado.

Recomendações importantes: o protetor facial deve ser

exclusivo de cada profissional; deve ser colocado sobre os olhos e ajustados em seguida. Após o uso, deve ser limpo e desinfetado com álcool líquido a 70%, hipoclorito ou semelhantes; lave com água e sabão/detergente, caso os óculos de proteção apresentem sujeira visível. Utilize o protetor facial sobre os óculos de grau, caso necessário. Se as suas mãos se contaminarem durante a retirada dos óculos de proteção, lave-as imediatamente ou use álcool 70%. Remova o protetor facial da parte anterior da cabeça levantando o laço ou a fita elástica em torno da cabeça.

LUVA DE PROCEDIMENTO

Objetivo: a luva de procedimento é utilizada para as práticas laboratoriais com o objetivo de evitar a contaminação por gotículas respiratórias e secreções e a disseminação de partículas virais. As luvas também são úteis em casos de atividades com risco químico e físico como cortes, calor e radiações (Figura 1C).

Público-alvo: o uso da luva de procedimento é destinado para os profissionais da saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: esse dispositivo de segurança deve ser utilizado durante qualquer contato com o paciente ou seu entorno.

Especificações: luvas de procedimento são estéreis para procedimentos assépticos e não estéreis para procedimentos não assépticos. Devem ser de látex, vinil ou nitrílicas, proporcionar barreira antimicrobiana e antiviral efetiva e permitir a execução de atividades com conforto.

Recomendações importantes: para o uso adequado desse dispositivo, as luvas devem ser puxadas até os punhos, de modo que cubram os punhos do avental ou macacão. Colocar as luvas antes da entrada no quarto do paciente ou área em que o paciente está isolado e em salas de processamento de amostras biológicas. Remova-as ainda dentro do quarto ou área de isolamento e descarte como resíduo infectante. Não utilize duas luvas (uma por cima da outra) para o atendimento dos pacientes, pois esta ação não garante mais segurança à assistência. Jamais saia do quarto ou área de isolamento com as luvas e nunca toque superfícies e materiais (ex: telefone, maçanetas, portas) utilizando-as. Nunca reutilize as luvas e proceda a higiene das mãos imediatamente após a sua retirada. Para retirar as luvas: usando a mão enluvada, pegue a luva da outra mão pela região da

palma e a retire; segure então a luva removida com a outra mão enluvada, deslize os dedos na mão sem luva por debaixo do punho da mão enluvada e retire a segunda luva, de modo que a primeira luva fique dentro da segunda luva (sequência ilustrada na Figura 2). Descarte as luvas em saco de lixo infectante (saco vermelho).

TOUCA/GORRO

As toucas são produzidas em diferentes materiais e devem proporcionar a oxigenação do couro cabeludo (Figura 1D).

Objetivo: a depender da atividade realizada, as toucas ou gorros devem ser usados para proteger os cabelos de contaminação por gotículas respiratórias e secreções e da disseminação de partículas virais ou ainda impedir que os cabelos contaminem uma área estéril.

Público-alvo: touca ou gorro são destinados para profissionais da saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: devem ser utilizadas durante procedimentos que podem gerar aerossóis.

Especificações: as toucas ou gorros devem ser descartáveis, confeccionadas de tecido-não-tecido (TNT), além de proporcionar barreira antiviral efetiva.

Recomendações importantes: as toucas ou gorros devem ser removidos após o uso, ainda com as luvas de procedimento nas mãos. Retirar a touca segurando na parte superior, com cuidado para não tocar no rosto, e descartá-la em saco de lixo para material infectante (saco vermelho).

PROPÉS

Os propés são geralmente produzidos de TNT/Algodão para serem utilizados em áreas estéreis, podendo ou não ser reutilizados a depender do material usado na sua produção ou do tipo de trabalho desenvolvido (Figura 1E).

Objetivo: proteger o calçado e evitar a contaminação e disseminação de partículas virais.

Público-alvo: o uso de propés é direcionado para os profissionais da saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: esse dispositivo de segurança deve ser utilizado

em caso da participação da assistência direta ou em caso suspeito ou confirmado.

Especificações: os propés são resistentes, confeccionados de TNT e descartáveis.

Recomendações importantes: os propés devem ser removidos antes de sair da área de assistência, ainda com as luvas de procedimento nas mãos e com cuidado para evitar contaminação. Devem ser descartados em saco de lixo infectante (saco vermelho).

MÁSCARA N95/PFF2 OU EQUIVALENTE (N99/PFF3, N100)

As máscaras de proteção são dispositivos de segurança para as vias aéreas como boca e nariz. São produzidas em tecido ou fibra sintética descartável, empregadas em situações de risco de geração de aerossóis e respingos de material potencialmente contaminado.

As máscaras ou respiradores N95, N99, N100 têm o filtro eficiente para retenção de partículas maiores que 0,3µm, vapores tóxicos e contaminantes presentes na atmosfera sob a forma de aerossóis.

Dentre as opções disponíveis, a máscara N95/PFF2 ou equivalente é a forma mais eficiente de proteção respiratória. Ela possui uma válvula de exalação que permite a saída do ar, além da gotícula. Sendo assim, ela protege o profissional, mas não o paciente. Em situações de alta demanda, como no caso da pandemia de coronavírus, a máscara N95/PFF2 ou equivalente pode ser utilizada pelos profissionais de saúde seguindo todas as preconizações rigorosas da retirada correta desse EPI (Figura F).

Objetivo: o uso de máscara de proteção é preconizado para evitar a contaminação da boca e nariz por gotículas respiratórias e a disseminação de partículas virais.

Público-alvo: Profissionais da saúde e população em geral.

Quando utilizar: ao realizar procedimentos geradores de aerossóis como intubação ou aspiração traqueal, ventilação mecânica, invasiva ou não invasiva, ressuscitação cardiopulmonar, ventilação manual antes da intubação e coleta de amostras nasotraqueais.

Especificações: possuem eficácia mínima na filtração de 95% a 99,9% de partículas de até 3µ e normalmente não são descartáveis.

Recomendações importantes: ajuste apropriadamente ao rosto. Nunca compartilhe com outro profissional. Não a utilize se estiver úmida, suja, rasgada ou com vincos. Realize a verificação do selo imediatamente após colocar a máscara. Não sobreponha a máscara

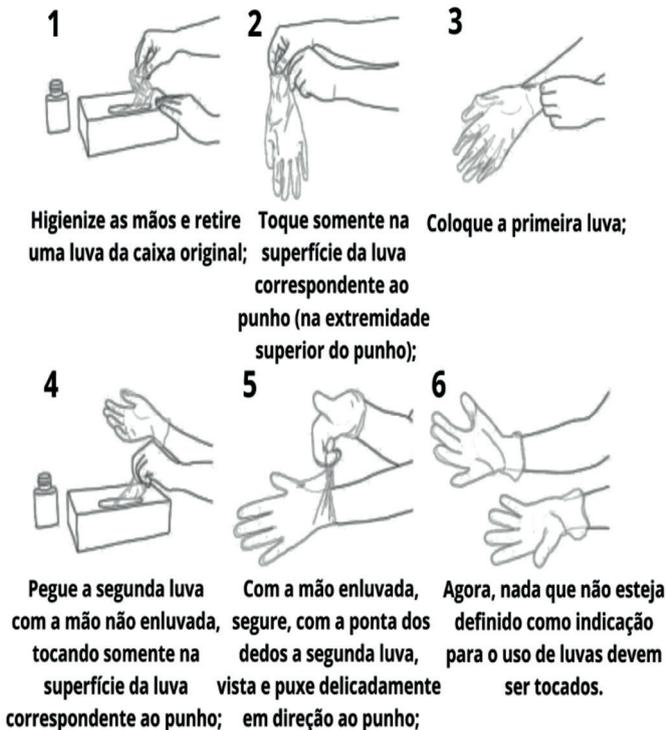
cirúrgica à máscara N95 ou equivalente. Para remover a máscara, retire-a pelos elásticos, tomando cuidado para não tocar na superfície interna da máscara. Em caso de carência de insumos, a máscara poderá ser reutilizada pelo mesmo profissional. Coloque-a em um saco ou envelope de papel com os elásticos para fora, após utilizar, caso for reutilizá-la. Nunca coloque a máscara já utilizada em um saco plástico, pois ela pode ficar úmida e assim, contaminada.

Figura 1 - Equipamentos de proteção individual. (A) Óculos de proteção; (B) Protetor facial; (C) Luva de procedimento; (D) Touca/Gorro; (E) Propé; (F) Máscara N95/PPF2.



FONTE: Compilação feita pelo autor, a partir de imagens coletadas no Google.

Figura 2 – Sequência de como vestir as luvas não estéreis.



FONTE: Adaptado de World Health Organization, 2009.

AVENTAL DESCARTÁVEL

Objetivo: evitar a contaminação da pele e da roupa do profissional, bem como a disseminação de partículas. Ou seja, o jaleco ou avental fornece uma barreira de proteção e diminui a chance de transmissão de micro-organismos e contaminação química (Figura 3A)

Público-alvo: profissionais da saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: durante a assistência direta ao caso suspeito ou confirmado.

Especificações: gramatura mínima de 30 g/m², mangas longas, punho de malha ou elástico e abertura posterior. Confeccionado em TNT, atóxico e hidro/hemorrepelente. Apresentar baixo desprendimento de partículas e ser resistente. Proporcionar barreira antimicrobiana e antiviral efetiva.

Recomendações importantes: avalie a necessidade de gramatura mínima de 50 g/m² em caso de vômitos, diarreia, hipersecreção orotraqueal ou sangramento. Remova o avental sujo e descarte-o como resíduo infectante. Remova-o após a realização do procedimento e antes de sair do quarto do paciente ou da área de assistência. Proceda a higiene das mãos após a remoção do avental.

MACACÃO DE ISOLAMENTO

Objetivo: evitar a contaminação da pele e da roupa do profissional e a disseminação de partículas virais.

Público-alvo: profissionais da saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: durante a assistência direta ao caso suspeito ou confirmado.

Especificações: cobrir o corpo inteiro, ter mangas longas, fechamento frontal e elástico no punho e tornozelo. Confeccionado em TNT, atóxico e hidro/hemorrepelente. Apresentar baixo desprendimento de partículas e ser resistente. Proporcionar barreira antimicrobiana e antiviral efetiva.

Recomendações importantes: após o uso, a frente e as mangas do macacão estão contaminadas! Se as suas mãos se contaminarem durante a retirada do macacão, lave-as imediatamente ou use álcool 70%. Abra o zíper do macacão tomando cuidado para que as mangas não entrem em contato com o seu corpo quando estiver abrindo a parte frontal. Retire o macacão de modo que ele fique longe do pescoço e dos ombros, tocando apenas o interior do macacão. Deixe o macacão ao avesso e descarte-o em saco de lixo infectante.

MACACÃO DE PROTEÇÃO IMPERMEÁVEL

Objetivo: evitar a contaminação da pele e roupa do profissional e a disseminação de partículas virais (Figura 3B).

Público-alvo: profissionais da saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: durante a assistência direta ao caso suspeito ou confirmado em procedimentos geradores de aerossóis.

Especificações: material impermeável, de mangas longas, fechamento frontal com zíper e pala com velcro. Tem plástico no capuz, punho e tornozelo. Ser uma barreira química efetiva e resistente à penetração viral.

Recomendações importantes: após o uso, a frente e as mangas do macacão estão contaminadas! Se as suas mãos se contaminarem durante a retirada do macacão, lave-as imediatamente ou use álcool 70%. Abra o zíper do macacão tomando cuidado para que as mangas não entrem em contato com o seu corpo quando estiver abrindo a parte frontal. Retire o macacão de modo que ele fique longe do pescoço e dos ombros, tocando apenas o interior do macacão. Deixe o macacão ao avesso e descarte-o em saco de lixo infectante.

CALÇADO FECHADO

Os profissionais com sandálias, calçados abertos ou de pano correm riscos de sofrer acidentes e lesões nos pés. Portanto, é necessário que o calçado seja compatível com o tipo de trabalho desenvolvido (Figura 3C)

Objetivo: proteger o calçado e evitar a contaminação e disseminação de partículas virais.

Público-alvo: profissionais da saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: durante o turno de trabalho e assistência direta ao caso suspeito ou confirmado.

Especificações: impermeável, solado de borracha, antiderrapante e resistente.

Recomendações importantes: remova após a realização do procedimento e antes de sair do quarto do paciente ou da área de assistência. Na remoção, tenha o devido cuidado para não encostar na pele.

CALÇA LONGA

Objetivo: proteger a pele e evitar a contaminação e disseminação de partículas virais (Figura 3D).

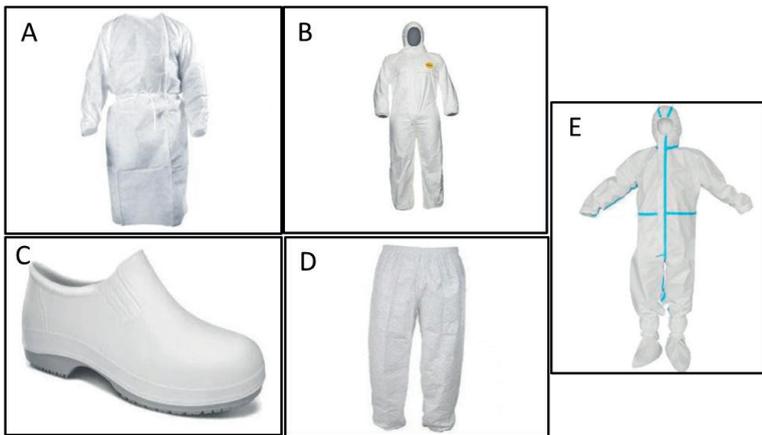
Público-alvo: profissionais da saúde e profissionais de apoio (higiene, limpeza, manutenção etc.).

Quando utilizar: durante o turno de trabalho e assistência direta ao caso suspeito ou confirmado.

Especificações: ser longa e confeccionada em tecido.

Recomendações importantes: remova a calça após a realização do procedimento e antes de sair do quarto do paciente ou da área de assistência. Na remoção, tenha o devido cuidado para não encostar a calça, que pode estar infectada, na pele. Além do uso correto dos EPIs, é necessário que as equipes de saúde estejam devidamente treinadas para a paramentação, remoção e descarte dos EPIs.

Figura 3 – Equipamentos de proteção individual. (A) Avental descartável; (B) Macacão impermeável; (C) Sapato fechado; (D) Calça longa; (E) Macacão de isolamento.



FONTE: Compilação feita pelo autor, a partir de imagens coletadas no Google.

A utilização dos dispositivos de segurança acima relatados é essencial para prevenir os riscos de contaminação no ambiente laboral. Por isso, a sua sequência e a maneira de instalação e retirada devem seguir as figuras abaixo (Figura 4). Antes de seguir a sequência

apresentada, é importante salientar que para vestir o avental, o profissional deve vestir o par de propés, realizar a higienização das mãos com solução alcoólica 70% e vestir o primeiro par de luvas.

É necessário enfatizar, que a maioria dos profissionais de saúde se contamina durante a retirada dos EPIs, devido à presença de vírus nesses dispositivos. Em especial, o capote/avental ou o macacão, os quais devem ser retirados de forma lenta e cuidadosa, para reduzir a chance de desprendimento do vírus que pode ficar na superfície e proporcionar a contaminação do ambiente e do profissional (Figura 5).

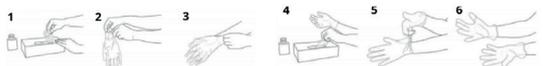
Figura 4 – Passo a passo para vestimenta dos EPIs.

Sequência para vestir EPIs

- 1 Avental Descartável**

 - 1) Cobrir totalmente o tronco, do pescoço aos joelhos, vestindo os braços até o punho;
 - 2) Amarrar as fitas atrás do pescoço e da cintura.
- 2 Mascára ou Respirador**

 - 1) Prender os elásticos ou fazer laços no meio da cabeça e no pescoço;
 - 2) Ajustar a banda flexível que cobre o nariz;
 - 3) Ajustar bem no rosto e abaixo do queixo;
 - 4) Fazer um teste para checar se a máscara está correta.
- 3 Óculos de proteção e protetor facial**

 - 1) Colocar sobre os olhos e rosto e ajustar para caber
- 4 Luvas**

 - 1) Higienize as mãos e retire uma luva da caixa original;
 - 2) Toque somente na superfície da luva correspondente ao punho (na extremidade superior do punho);
 - 3) Coloque a primeira luva;
 - 4) Pegue a segunda luva com a mão não enluvada, tocando somente na superfície da luva correspondente ao punho;
 - 5) Com a mão enluvada, segure, com a ponta dos dedos a segunda luva, vista e puxe delicadamente em direção ao punho;
 - 6) Agora, nada que não esteja desinfetado como indicação para o uso de luvas devem ser tocados.

USE PRÁTICAS DE TRABALHO SEGURAS PARA PROTEGER-SE E EVITAR A DISSEMINAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO

- Mantenha as mãos afastadas do rosto;
- Minimize o toque em superfícies;
- Troque as luvas quando rasgadas ou altamente contaminadas;
- Realize a higienização das mãos

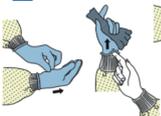
FONTE: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020.

Figura 5 – Passo a passo para a remoção de EPIs. Na etapa 1, remover o par de luvas mais externo. Ao concluir a etapa 4 (retirada das máscaras), deve-se retirar os propés, e por último, retirar as luvas.

Sequência para remover EPIs

Todos os EPIs estão com a parte externa contaminadas!

1 Luvas



- 1) Se suas mãos se contaminarem durante a remoção das luvas, higienize-as imediatamente;
- 2) Usando uma mão enluvada, segure a palma da outra mão enluvada e retire a primeira luva;
- 3) Segure a luva que foi removida na mão enluvada;

- 4) Na mão enluvada, deslize os dedos da mão sem luva pelo punho e por baixo da luva e retire a segunda luva sobre a primeira luva;
- 5) Descarte as luvas em um recipiente de lixo

2 Óculos de proteção e protetor facial



- 1) Se suas mãos se contaminarem durante a remoção, higienize-as imediatamente;
- 2) Remova os óculos de proteção ou o protetor facial, levantando as fitas ou laços da cabeça ou orelhas;

- 3) Se o item for reutilizável, coloque-o em recipiente designado para reprocessamento. Caso contrário, descarte em lixo biológico.

3 Avental descartável



- 1) Se suas mãos se contaminarem durante a remoção do avental, higienize-as imediatamente;
- 2) Desfaça os laços do avental, tomando cuidado para que as mangas não entrem em contato com seu corpo ao desfazer os laços.
- 3) Afaste o avental do pescoço e dos ombros, tocando o interior do mesmo e vire-o de dentro para fora;
- 4) Enrole o avental pelo avesso e descarte-o em lixo biológico.

4 Máscara ou Respirador



- 1) Se suas mãos se contaminarem durante a remoção do avental, higienize-as imediatamente;
- 2) Solte os elásticos ou fitas da parte inferior e depois os que estão na parte superior e remova sem tocar na frente;
- 3) Descarte-o em lixo biológico ou coloque-o em recipiente adequado para o reprocessamento.

HIGIENIZE AS MÃOS APÓS A REMOÇÃO DE TODOS OS EPIs

FONTE: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2020.

DISTANCIAMENTO SOCIAL

Medidas legais de distanciamento social foram incorporadas no Brasil a partir do mês de março de 2020, com o objetivo de mitigar o

avanço da transmissão da COVID-19. A implementação destas medidas foi baseada nas informações preconizadas por órgãos de saúde pública nacional e internacional e sustentadas na literatura científica (COWLING et al., 2020; JACKSON et al., 2020; FONG et al., 2020).

As medidas de distanciamento social no laboratório podem ser atingidas separando os profissionais em dois ou mais grupos, além de implementar um sistema de escala de 12 e 36 horas de folga, com o objetivo de impedir o contato entre as equipes (MARTINELLO, 2020).

Os profissionais de saúde que efetuam a análise ou a validação dos resultados, que analisam o controle da qualidade ou que desempenham as funções mais administrativas podem ser deslocados do espaço do laboratório para realizar suas tarefas em um espaço de escritório ou remotamente (GARDEZI; IKRAM, 2020; TAN et al., 2020). A educação continuada e os treinamentos também devem ser realizados de forma remota.

Em relação às refeições, sugere-se a elaboração de um sistema de escala com pelo menos 4 pessoas para o uso dos espaços de refeição para impedir a reunião da equipe.

É preconizada a política de imunização contra a gripe que também oferece proteção aos profissionais do laboratório e diminui a suspeita de contaminação por SARS-CoV-2 no grupo em situações de emergência da pandemia (MOURYA et al., 2020).

Neste momento da pandemia da COVID-19, todas as amostras obtidas após a coletas para exames de diagnóstico *in vitro* devem ser consideradas potencialmente infecciosas com SARS-CoV- 2. Por isso, os profissionais de laboratório devem cumprir de forma rigorosa as boas práticas laboratoriais e os cuidados padrão discutidos em seções anteriores para reduzir o risco de exposição ao vírus (BYRD et al., 2019; LIPPI et al., 2020). Utilizar os EPIs de forma correta não apenas minimiza a transmissibilidade do SARS-CoV-2, mas também potencializa o cuidado na saúde da população.

REFERÊNCIAS

BYRD J. J. Emmert E, Maxwell R, Townsend H; ASM Task Committee on the Revision of the 2012 Laboratory Biosafety Guidelines. Guidelines for Biosafety in Teaching Laboratories Version 2.0:

A Revised and Updated Manual for 2019. J Microbiol Biol Educ. 2019;20(3):20.3.57. Published 2019 Dec 18. doi:10.1128/jmbe.v20i3.1975.

CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel; Instructions for Use. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>. Acesso em 12 de maio de 2020.

COWLING, BENJAMIN J., et al. Impact assessment of non-pharmaceutical interventions against coronavirus disease 2019 and influenza in Hong Kong: an observational study. The Lancet Public Health, 2020.

FONG, MIN W. et al. Nonpharmaceutical measures for pandemic influenza in nonhealthcare settings – social distancing measures. Emerg. Infect. Dis., v. 26, n. 5, p. 26, 2020.

GARDEZI, Syed Adeel Hussain; IKRAM, Aamer. Application of bio-safety principles in Laboratory Analysis of Clinical Samples from patients with COVID-19. Laboratory Science, v. 70, n. 5, 2020.

Google. Pesquisa inicial: www.google.com. Figura 1A, disponível em: <<https://www.superepi.com.br/oculos-de-protecao-fenix-da-14500--p1046024>> Acesso em: 16 de Agosto de 2020. Figura 1B, disponível em: <https://www.ispsaude.com.br/mascara-protetora-facial-kit-com-50-un-face-shield-reutilizavel-e-ajustavel-arktus-p-KT00167A> Acesso em 16 de Agosto de 2020. Figura 1C, disponível em: <<https://canalsuperepi.com.br/luvas-de-procedimento-vinil-latex-nitrilica-procedimento-artigo/>>. Acesso em 16 de Agosto de 2020. Figura 1D, disponível em < <https://www.ispsaude.com.br/touca-descartavel-sanfonada-100un-derma-plus-p-ME03228A>> Acesso em 16 de Agosto de 2020. Figura 1E, disponível em: <<https://www.oxivital.com.br/produto/sapatilha-pro-pe-branca/>>. Acesso em 16 de Agosto de 2020. Figura 1F, disponível em: <https://farmaciaartpharma.com>.

[br/mascara-pff2-s-valvula-deltaplus](https://www.widestock.com.br/mascara-pff2-s-valvula-deltaplus)> Acesso em 16 de Agosto de 2020. Figura 3A, disponível em: <<https://www.widestock.com.br/aventail-descartavel-tnt-m-long-gr30-c-10.html>> Acesso em 16 de Agosto de 2020. Figura 3B, disponível em: <<https://casadoepi.com.br/produto/macacao-easysafe-trrchf5s-du-pont-15400/>> Acesso em 16 de Agosto de 2020. Figura 3C, disponível em: <<http://www.grupobt.com.br/produto/sapato-cartom-1000-impermeavel-antiderrapante-branco-ca-41773/>>. Acesso em 16 de Agosto de 2020. Figura 3D, disponível em: <<https://www.epibrasil.com.br/calca-em-tyvek-ty351s-p4798/>>. Acesso em 16 de Agosto de 2020. Figura 3E, disponível em: <https://www.medicalexpo.com/pt/fabricante-medico/macacao-protecao-46127.html>>. Acesso em 16 de Agosto de 2020.

JACKSON, MICHAEL L. et al. Effects of weather-related social distancing on city-scale transmission of respiratory viruses. MedRxiv, 2020.

LIPPI G. Governance of pre-analytical variability: traveling the right path to the bright side of the moon? Clin Chim Acta. 2009;404(1):32-6.

MARTINELLO, Flávia. Biossegurança laboratorial na pandemia do SARS-CoV-2. A Tempestade do Coronavírus, v. 52, n. 2, p. 109-16, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. Classificação de risco dos agentes biológicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. - 3ª ed. - Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 48 p.

MINISTÉRIO DO TRABALHO E EMPREGO (Brasil). Portaria nº 877 de 24 de outubro de 2018. Altera a redação da Norma Regulamentadora nº 6. Equipamento de Proteção Individual de

1978. Disponível em: <https://www.gov.br/trabalho/pt-br/inspecao/escola>. Acesso em 19 de julho de 2020.

MOURYA DT, SAPKAL G, YADAV PD, M BELANI SK, SHETE A, GUPTA N. Biorisk assessment for infrastructure & biosafety requirements for the laboratories providing coronavirus SARS-CoV-2/ (COVID-19) diagnosis. *Indian J Med Res.* 2020;151(2 & 3):172-176. doi:10.4103/ijmr.IJMR_763_20.

TAN SS, YAN B, SAW S, LEE CK, CHONG AT, JUREEN R, SETHI S. Practical laboratory considerations amidst the COVID-19 outbreak: early experience from Singapore. *J Clin Pathol.* 2020; jclinpath-2020-206563. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206563.

2 HIGIENIZAÇÃO DAS MÃOS

A higiene das mãos é largamente caracterizada como uma das principais formas para evitar as infecções relacionadas à assistência à saúde (PRICE et al., 2018). De acordo com a ANVISA (2009), a higienização das mãos inclui a higiene simples com água e sabonete, a higiene antisséptica e a antissepsia cirúrgica ou preparo pré-operatório das mãos. Os agentes antissépticos utilizados contra vírus podem ser álcool, clorexidina ou triclosan.

Nos últimos anos, a higiene das mãos tem sido alvo de interesse nas dependências dos serviços da saúde para evitar a disseminação dos micro-organismos, principalmente os multirresistentes, transmitidos pelas mãos dos profissionais de saúde (BRASIL, 2009).

As mãos infectadas são consideradas uma das principais vias de veiculação de contaminação. Assim, estimular o simples hábito de higienizar as mãos com o objetivo de remover micro-organismos, e ainda, as células descamativas, pelos, suor, sujeiras e oleosidade da pele, pode auxiliar na redução de risco de contaminação.

Portanto, nesta seção serão abordadas algumas recomendações em relação à higienização das mãos com água e sabão e solução alcoólica, visando contribuir ao correto procedimento.

HIGIENIZAÇÃO COM ÁGUA E SABÃO

Para a correta higienização é necessária a retirada de todos os acessórios (relógio, pulseiras, anéis), uma vez que eles retêm forte incidência de alocação de micro-organismos.

Profissionais que usam óculos de grau: devem lavar os óculos com água e sabão, aplicar álcool 70% e ajustar os óculos no rosto;

Observação: *Não se recomenda o uso de lentes de contato.*

Lavagem das mãos: proceda com a higienização das mãos, imediatamente após retirar as luvas e, também, após contato com sangue, fluidos corpóreos, secreções, excreções ou objetos contaminados.

Higienização das mãos com água e sabão: abra a torneira e molhe as mãos, evitando contato com a pia. Aplique na palma da mão quantidade suficiente de sabonete líquido para cobrir todas as superfícies das mãos. Ensaboe as palmas das mãos, friccionando-as entre si: esfregue a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa. Entrelace os dedos e friccione os espaços interdigitais. Esfregue o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta. Segurando os dedos, com movimento de vai e vem e vice-versa. Esfregue o polegar direito, com o auxílio da palma da mão esquerda, utilizando movimentos circulares, e vice-versa. Friccione as polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita, fechada em concha, fazendo movimentos circulares e vice-versa. Enxague as mãos. Evite contato direto das mãos ensaboadas com a torneira. Seque as mãos com papel toalha descartável. Use sempre o papel toalha para fechar torneiras. Duração do procedimento de 40 a 60 segundos.

Para uma boa prática de higienização das mãos com água e sabão, com a intenção de minimizar a veiculação dos micro-organismos, segue nas figuras abaixo as sequências de lavagem correta das mãos (Figura 6).

HIGIENIZAÇÃO COM SOLUÇÃO ALCOÓLICA

Quando realizar o procedimento: após risco de exposição a fluidos corporais e antes e após a remoção de luvas.

Fricção antisséptica das mãos (com preparações alcoólicas de álcool gel ou solução líquida a 70%): aplique na palma da mão quantidade suficiente do produto para cobrir todas as superfícies das

mãos (seguir a quantidade recomendada pelo fabricante). Friccione as palmas das mãos entre si: a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda, entrelaçando os dedos e vice-versa. Friccione as palmas das mãos entre si, com os dedos entrelaçados e o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta, segurando os dedos, e vice-versa. Friccione o polegar direito, com o auxílio da palma da mão esquerda, utilizando-se de movimento circular, e vice-versa. Friccione as polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita, fazendo movimentos circulares, e vice-versa. Repita os movimentos até secar espontaneamente (NÃO utilize papel toalha). Duração do procedimento de 20 a 30 segundos.

Figura 6 – Passo a passo da higienização das mãos com água e sabão.

Higienização das mãos com água



Duração de todo procedimento: 40-60



0 Molhe as mãos;



1 Aplique na palma da mão quantidade suficiente de sabão para cobrir todas as superfícies das mãos;



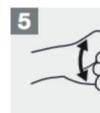
2 Ensaboe as mãos, fricte



3 Esfregue a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa;



4 Entrelace os dedos e friccione os espaços interdigitais;



5 Esfregue o d de uma mão mão oposta dedos, com i vai-e-vem



6 Esfregue o polegar esquerdo, com o auxílio da palma da mão direita, utilizando-se de movimento circular e vice-versa;



7 Friccione as polpas digitais da mão direita contra a palma da mão esquerda, fazendo movimento circular e vice-versa;



8 Enxágue mãos c

FONTE: Adaptado de World Health Organization, 2009.

Segue nas figuras abaixo a sequência das formas adequadas para higienização das mãos com solução alcoólica, com o objetivo de reduzir a transmissão dos agentes infecciosos (Figura 7).

Figura 7 – Higienização das mãos com soluções alcoólicas.

Fricção antisséptica das mãos com preparações alcoólicas



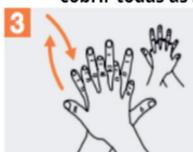
Duração de todo procedimento: **20-30 segundos**



1a Aplicar uma quantidade suficiente de preparação alcoólica em uma mão em forma de concha para cobrir todas as superfícies das mãos;



2 Friccione as palmas das mãos entre si;



3 Friccione a palma direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa;



4 Friccione a palma das mãos entre si com os dedos entrelaçados;



5 Friccione dorso de uma mão com a palma da mão oposta, segurando os dedos, com movimento de vai-e-vem e vice-versa;



6 Friccione o polegar esquerdo, com o auxílio da palma da mão direita, utilizando-se de movimento circular e



7 Friccione as polpas digitais e unhas, da mão direita contra a palma da mão esquerda, fazendo um movimento circular e



8 Quando estiverem secas, suas mãos estarão seguras.

FONTE: Adaptado de World Health Organization, 2009.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Segurança do Paciente em Serviços de Saúde: Higienização das Mãos / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2009. 105p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do Paciente em Serviços de Saúde – Higienização das Mãos. Brasília; 2009.

PRICE, L.; MELONEA, L.; MCLARNONA N.; BUNYAN, D.; KILPATRICK, C.; FLOWERSA, P.; REILLYA, J. A Systematic Review to evaluate the evidence base for the World Health Organization's adopted Hand Hygiene Technique for reducing the microbial load on the hands of Healthca workers. American Journal of Infection Control, v. 46, p. 814-23, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. WHO guidelines on hand hygiene in health care: first global patient safety challenge clean care is safer care. World Health Organization, 2009.

3 DESCONTAMINAÇÃO DE EQUIPAMENTOS E SUPERFÍCIES E DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO

RECOMENDAÇÕES PARA DESCONTAMINAÇÃO DE SUPERFÍCIES E EQUIPAMENTOS

Após o processamento das amostras, as superfícies e os equipamentos de trabalho devem ser descontaminados com os desinfetantes apropriados. Para esse fim, use qualquer desinfetante hospitalar registrado. As recomendações do fabricante para uso/diluição (ou seja, concentração), o tempo de contato e os cuidados no manuseio devem ser seguidos atentamente. Abaixo seguem informações sobre os desinfetantes recomendados e os procedimentos para descontaminação.

DESINFETANTES APROPRIADOS

a) Hipoclorito de sódio (água sanitária)

- Concentração:
 - 0,1% para desinfecção superficial;
 - 1% para desinfecção de derramamentos de sangue;

- Tempo de contato: 5 a 10 minutos;
- Deve-se utilizar luvas ao manusear e preparar soluções de hipoclorito de sódio;
- Recomenda-se o uso de óculos de proteção devido a possíveis respingos;
- A solução de hipoclorito de sódio deve ser feita diariamente;
- Recomenda-se o uso em superfícies duras e não porosas;
- A água sanitária pode danificar os tecidos e ser corrosiva para os metais.

Tabela 1 – Protocolo para preparo de Solução de Hipoclorito 0,1% para higienização.

VOLUME DE ÁGUA	VOLUME DE HIPOCLORITO DE SÓDIO COMERCIAL BRASILEIRO (12%)	VOLUME FINAL
297,5mL	2,5mL	300mL
495,83mL	4,17mL	500mL
991,66mL	8,34mL	1L
4.958,33mL	41,67mL	5L

Fonte: Autoria própria.

b) Etanol

- Concentração: 62-71% de etanol
- Tempo de contato: 1minuto

ROTINA DE HIGIENIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES

Superfícies pouco tocadas como chão, teto, paredes e persianas devem ser higienizadas diariamente ou em caso de exposição a fluídos. Já as superfícies frequentemente tocadas, como puxadores de porta, superfícies de mesa, interruptores e dispositivos portáteis, devem ser higienizados diariamente ou com a maior frequência possível.

Deve-se utilizar:

- Detergente estabelecido na rotina;
- Solução de hipoclorito 0,1%;
- Álcool 70%.

Sabe-se que o coronavírus humano, em geral **persiste em superfícies inanimadas** como metal, vidro ou plástico por **até 9 dias** (OPAS, 2020). Para limpeza de pisos, deve-se proceder a varredura úmida com soluções desinfetantes (hipoclorito de sódio 0,1 %, ácido peracético, quaternários de amônia e compostos fenólicos) (ANVISA, 2012). Realize a limpeza utilizando movimentos simples, amplos, em um só sentido, do mais limpo para o mais sujo, a fim de evitar sujar áreas já limpas. **Atenção:** a varredura seca com vassoura é proibida!

DESCARTE DE MATERIAL BIOLÓGICO

O lixo biológico proveniente das salas de processamento deve ser acondicionado preferencialmente em sacos vermelhos próprios para o descarte de material infectado. Enquanto o lixo proveniente da sala de amplificação do cDNA do vírus poderá ser acondicionado em sacos brancos. Ambos os sacos devem ser recolhidos e incinerados por uma empresa especializada.

Os Resíduos de Serviço de Saúde precisam ser acondicionados em saco vermelho, o qual deve ser substituído quando atingir 2/3 de sua capacidade ou pelo menos 1 vez a cada 48 horas, independentemente do volume, e identificado pelo símbolo de Resíduo Infectante (Figura 8).

Figura 8 – Símbolo presente em sacos com resíduo infectante.



OBSERVAÇÃO: Apesar da RDC 222/2018 definir que os resíduos provenientes da assistência a pacientes com coronavírus devem ser acondicionados em saco vermelho, excepcionalmente durante essa fase, caso não possua sacos vermelhos para atender a demanda, poderá utilizar-se os sacos brancos, com o símbolo de infectante, para acondicionar esses resíduos.

REFERÊNCIAS

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies. 2012.

OPAS, Orientações de biossegurança laboratorial relativa à doença do coronavírus (COVID-19), 2020. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51968/OPASBRACOV1920019_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y Acesso em: 18. Set. 2020.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018. Publicada no DOU nº 61, de 29 de março de 2018. Disponível em: http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/phoca-download/Noticias/2018/GESAM/02_rdc_222_2018.pdf. Acesso em: 18. Set. 2020.

4 COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRA

Idealmente, amostras de pacientes suspeitos devem ser coletadas assim que a hipótese diagnóstica da COVID-19 surgir, baseada em critérios clínicos e epidemiológicos.

Para o diagnóstico inicial da COVID-19, o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) dos EUA recomenda a utilização de (i) amostras advindas do trato respiratório superior, preferencialmente na forma de *swab* nasofaríngeo, cuja coleta deve ser feita com um único *swab* de poliéster com haste de plástico, retirando amostra das duas narinas; ou (ii) coleta de amostras do trato respiratório inferior, principalmente na forma de escarro, a qual também é recomendada quando o paciente apresenta tosse produtiva.

Todas as amostras coletadas para investigações laboratoriais devem ser consideradas potencialmente infecciosas. Abaixo segue a lista dos materiais necessários para esta etapa de coleta.

MATERIAIS REQUERIDOS

- a) EPI's;
- b) Avental descartável, óculos, máscara N95, protetor facial e luvas;

- c) *Swab* de fibra sintética (não utilizar de outros tipos, pois podem conter substâncias que inibam a ampliação do material viral);
- d) Tubos estéreis com meio de transporte viral (VTM, do inglês: *viral transport media*) (ou meio universal) ou solução salina estéril;
- e) Palitos descartáveis (abaixadores de língua em caso de coleta de orofaringe);
- f) Geladeira e freezer (4 °C / -20 °C / -70 °C);
- g) Isopor ou outro recipiente hermeticamente fechado;
- h) Bolsa térmica de gel ou gelo rígido reutilizável;
- i) Etiquetas e marcadores permanentes;
- j) Solução de descontaminação.

OBSERVAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

O trabalho de laboratório de diagnóstico não propagativo deve ser realizado em instalações e procedimentos equivalentes ao Nível de Biossegurança 2 (NB2).

Abaixo apresenta-se o passo a passo para as coletas:

- **Coleta de nasofaringe:** com o indivíduo sentado e a cabeça inclinada para trás, introduza o *swab* em uma das narinas, paralelamente ao palato, até uma profundidade próxima à abertura externa da orelha. Deixe o *swab* no local por alguns segundos para absorver as secreções e, então, remova-o girando lentamente. Coloque os *swabs* imediatamente em tubos estéreis contendo 4-5mL de VTM ou meio universal. Na ausência do meio adequado, as amostras poderão ser acondicionadas em solução salina estéril;
- **Coleta de orofaringe:** introduza o *swab* através da boca até chegar na faringe posterior e raspar essa região da mucosa, evitando contato com a língua ou outra mucosa da região oral.

Coloque os *swabs* imediatamente em tubos estéreis contendo 4-5mL de meio de VTM ou meio universal. Na ausência do meio adequado, as amostras poderão ser acondicionadas em solução salina estéril. Caso forem coletados *swabs* das duas regiões, estes devem ser colocados no mesmo tubo;

Observação: Segundo a nota técnica nº 34/2020, da Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde, foi recomendado a utilização de apenas um swab por paciente, para as duas narinas, em decorrência da escassez mundial de insumos laboratoriais.

Outros requisitos importantes para a coleta e armazenamento das amostras, são listados abaixo:

- Identificação das amostras com as informações pertinentes: identificação do paciente, data da coleta, tipo de amostra;
- Refrigeração das amostras à 2 a 8°C (geladeira) até o transporte ao laboratório em um período máximo de 24 a 72 horas após a coleta. Caso ultrapasse esse período, congele a -20°C ou preferencialmente a -70°C;
- Transporte as amostras que estão na geladeira em recipiente hermético com bolsa de gelo caso, o transporte dure menos que 5 dias; Transporte as amostras congeladas a -70°C em recipiente hermeticamente fechado com gelo seco, se o transporte for durar mais que 5 dias. Para o transporte, é essencial que o meio viral contenha antibiótico e antimicótico. Evite ciclos repetidos de congelamento e descongelamento; se a amostra já estiver congelada, envie-a em gelo seco. A Tabela 2 resume as principais recomendações para a temperatura de armazenamento e transporte.

Tabela 2 – Armazenamento e transporte das amostras
(continua)

TIPO DE AMOSTRA	MATERIAIS DE COLETA	TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO	TEMPERATURA RECOMENDADA PARA ENVIO DE ACORDO COM O TEMPO DE ENVIO ESPERADO
Swab nasal- faríngeo e oreo- faríngeo	Swab com flocos de Dacron ou poliéster	2-8°C	2-8°C se ≤5 dias -70°C (gelo seco) se > 5 dias
Lavagem bronco- alveolar	Tubo estéril	2-8°C	2-8°C se ≤2 dias -70°C (gelo seco) se > 2 dias
(Endo) aspirado traqueal, lavagem/ aspirado naso- faríngeo ou nasal	Tubo estéril	2-8°C	2-8°C se ≤2 dias -70°C (gelo seco) se > 2 dias
Escarro	Tubo estéril	2-8°C	2-8°C se ≤2 dias -70°C (gelo seco) se > 2 dias
Tecido de biópsia ou autópsia, incluindo pulmão	Tubo estéril com salina ou VTM	2-8°C	2-8°C se ≤24 horas -70°C (gelo seco) se > 24 horas
Sangue total	Tubo de coleta	2-8°C	2-8°C se ≤5 dias -70°C (gelo seco) se > 5 dias

Tabela 2 – Armazenamento e transporte das amostras
(continuação)

TIPO DE AMOSTRA	MATERIAIS DE COLETA	TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO	TEMPERATURA RECOMENDADA PARA ENVIO DE ACORDO COM O TEMPO DE ENVIO ESPERADO
Soro	Tubos separadores de soro (adultos: coletar 3-5mL de sangue total)	2-8°C	2-8°C se ≤5 dias -70°C (gelo seco) se > 5 dias
Fezes	Recipiente para coleta de fezes	2-8°C	2-8°C se ≤5 dias -70°C (gelo seco) se > 5 dias
Urina	Recipiente para coleta de urina	2-8°C	2-8°C se ≤5 dias -70°C (gelo seco) se > 5 dias

Fonte: adaptado de World Health Organization, 2020.

REFERÊNCIAS

CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel; Instructions for Use. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>. Acesso em 12 de Maio de 2020.

NOTA TÉCNICA Nº 34/2020-CGLAB/DAEVS/SVS/MS. Disponível em: http://www.lacen.saude.pr.gov.br/sites/lacen/arquivos_restritos/

[files/documento/2020-09/nota_tecnica_34_0.pdf](#). Acesso em 10 de Novembro de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Biosafety guidelines for handling of SARS specimens. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome/technical-guidance/biosafety/who-biosafety-guidelines-for-handling-of-sars-specimens>. Acesso em 10 de Novembro de 2021.

5 RECEBIMENTO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA COVID-19

O recebimento e processamento das amostras biológicas são etapas que fazem parte da fase pré-analítica do Sistema de Controle de Qualidade (SCQ). A fase pré-analítica é uma fase que antecede a etapa de análise das amostras e inicia-se com a preparação do paciente, a coleta da amostra, o transporte, o recebimento, o manuseio, o processamento e a entrega das amostras para o setor da análise (MOTTA, 2009; COSTA; MORELI, 2012; GUIMARÃES et al., 2011; GONÇALVES, 2020).

Os relatos na literatura apontam que a fase pré-analítica é a fase em que ocorrem maiores taxas de erros e maiores riscos à saúde dos profissionais. Esses problemas podem ser ocasionados pela alta rotatividade dos profissionais, negligência, pela falta de conhecimento sobre as boas práticas do laboratório e treinamento ineficaz (CAPITANI et al., 2002; PLEBANI; LIPPI, 2009; LIPPI, 2009; GUIMARÃES et al., 2011).

O recebimento e processamento das amostras para realização dos testes de diagnóstico da COVID-19 iniciam-se após a coleta e transporte das amostras biológicas. E devem ser realizados em conformidade com os critérios previamente estabelecidos pelo laboratório clínico responsável. Ambas as etapas de recebimento e processamento de amostras devem ser realizadas em salas devidamente

isoladas e restritas a pessoal treinado e paramentado. Devem seguir todos os protocolos que visam à redução do risco de contaminação dos profissionais e de contaminação das amostras a serem avaliadas. Cada laboratório deve avaliar os riscos específicos do local e da atividade para tentar mitigá-los.

O recebimento consiste na verificação das características das amostras, quando se deve observar a integridade dos tubos, a presença do(s) *swab(s)* utilizado(s) na coleta, o volume da solução de transporte, VTM e tampão fosfato-salino (PBS, do inglês: *phosphate buffered saline*), além de verificar se as amostras se encontram corretamente acondicionadas. De acordo com o CDC, as amostras processadas em até 72 horas após a coleta devem ser armazenadas em temperaturas de +2°C a +8°C e -70°C ou temperatura menor para amostras que serão processadas mais de 72 horas após a coleta.

Após a conferência dos aspectos das amostras é indispensável verificar a identificação de todas as amostras recebidas, que devem especificar o local de coleta, o dia e horário, testes requisitados e dados que permitam a identificação do indivíduo coletado. Em seguida são gerados os códigos de identificação para que as amostras possam ser processadas.

O processamento das amostras tem o objetivo de remover o(s) *swab(s)* da solução de transporte, aliquotar a solução de transporte e realizar a inativação viral, dependendo do protocolo de extração de RNA utilizado.

A rotina para realização dos testes para diagnóstico da COVID-19 pode ser realizada em laboratório com NB-II, por ser um espaço adequado para trabalho com sangue humano, líquidos corporais, tecidos ou linhagens celulares primárias humanas em que a presença de um agente infeccioso não é conhecida. Todas as etapas do processamento são realizadas em uma cabine de segurança, que representa uma barreira de proteção primária.

A cabine de segurança biológica (CSB) oferece proteção significativa para o manipulador e para o meio ambiente, além de proteger os materiais dentro da cabine de contaminações externas (ANVISA, 2008). A CSB é um equipamento de barreira de contenção física primária para os agentes infecciosos e a depender do modelo pode proteger o material e/ou o trabalhador e os ambientes interno e externo por filtração do ar com filtros de alta eficiência do tipo HEPA ou ULPA (OMS, 2004; MARTINELLO, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que todas as amostras clinicamente suspeitas de SARS-CoV-2 devem ser

processadas em CSB Classe II do tipo A2, visto que esse modelo protege tanto o trabalhador quanto as amostras e o ambiente. A CSB Classe I é autorizada pela OMS para a proteção dos profissionais quando a proteção das amostras não é prioridade (OMS, 2004; GARDEZI; IKRAM, 2020).

RECOMENDAÇÕES AO UTILIZAR A CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Antes do uso, a superfície da cabine e os materiais de trabalho devem ser higienizados com álcool etílico 70% e o material deve ser acondicionado no interior da cabine e a lâmpada ultravioleta (UV) do interior deve ser ligada por no mínimo 15 minutos. A lâmpada UV tem um alarme de segurança que só permite seu funcionamento com o vidro frontal totalmente fechado, essa ação irá auxiliar na descontaminação da área de trabalho e materiais.

Os seguintes materiais devem estar no interior da cabine para realização do processamento de amostras para o diagnóstico da COVID-19: vórtex, micropipetas (10, 200 e 100µl), ponteiras com barreira (10, 200 e 100µl), criotubos, canetas e etiquetas, lixo e saco branco para o descarte do material biológico, pinça inox, tubos do tipo Eppendorf de 1,5mL, tubos do tipo Falcon, estantes, borrifadores com álcool 70%, papel toalha e caixa de luvas.

Após 15 minutos de funcionamento da UV, deve-se acionar o fluxo laminar que possui um sistema de exaustão contendo filtros que são responsáveis pela renovação ou recirculação do ar, e aguardar o tempo de estabilização do fluxo, que dura aproximadamente 3 minutos. Realizadas as operações iniciais para o correto funcionamento do fluxo, o operador pode acessar o interior da cabine de fluxo com as mãos e aguardar 1 minuto para iniciar o trabalho.

DENTRO DA CABINE DE BIOSSEGURANÇA DE CLASSE II

Numere cada falcon, criotubo e eppendorf de acordo com código de cada paciente, em seguida leve cada amostra ao vórtex por 20 segundos. Abra o tubo falcon cuidadosamente (para não haver formação de aerossóis ou derramamento), a tampa do tubo deve estar voltada

para cima (para evitar que algum restante de líquido entre em contato com a cabine e haja alguma contaminação). Com o auxílio de uma pinça, pressione bem o *swab* contra a parede do tubo Falcon e descarte o *swab*. Transfira 200µl ou 20µl do conteúdo do tubo falcon para um tubo do tipo Eppendorf de 1,5mL ou 2mL e, então, transfira 2mL do conteúdo para um criotubo. As amostras que serão processadas para a realização do RT-qPCR da COVID-19 devem ser aliquotadas de acordo com o protocolo de extração do RNA viral (automatizado ou manual) em tubos de Eppendorfs identificados e os criotubos devem ser encaminhados para armazenamento a -80°C. O armazenamento de 2mL do material deve ser realizado para todas as amostras e poderá ser utilizado em situações específicas, como solicitações de repetição do teste para confirmação do resultado.

Observação: *após o processamento de cada amostra, desinfete a sua luva e a pinça com bastante álcool a 70% e siga os mesmos passos para a amostra seguinte. Caso o material biológico entre em contato direto com a luva, recomenda-se realizar a troca da luva por medida de segurança.*

OBSERVAÇÕES GERAIS

Essas recomendações são baseadas nas Diretrizes Internas de Biossegurança do Laboratório do CDC para Manuseio e Processamento de espécimes associados ao novo coronavírus de 2019 (2019-nCoV).

OBSERVAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

As recomendações gerais de biossegurança para trabalhar com material potencialmente infeccioso devem ser observadas e seguidas. Então, antes de iniciar os procedimentos é necessário retirar todos os acessórios (relógio, pulseiras, anéis).

Deve-se realizar a correta paramentação que deve incluir o uso de avental, macacão de proteção impermeável, propés, luvas, máscara ou respirador, sapatos fechados, óculos de proteção e protetor facial. O correto manuseio para vestir e retirar todos os EPIs encontram-se especificados no Capítulo 1.

Além disso, a higienização das mãos com água e sabão e a fricção antisséptica com soluções alcoólicas devem fazer parte do protocolo e podem ser consultadas detalhadamente no Capítulo 2.

Após a correta higienização e paramentação, o profissional está pronto e autorizado a ultrapassar a marcação vermelha do piso e entrar na área de recebimento e manuseio das amostras biológicas. É importante se certificar de que todos os materiais necessários para os procedimentos se encontram na cabine e tenham sido expostos à luz UV por no mínimo 15 minutos.

RECOMENDAÇÕES ESPECÍFICAS PARA O MANUSEIO DE AMOSTRAS QUE PODEM CONTER 2019 NCOV

*Para evitar a amplificação e concentração de partículas virais, **NÃO é recomendado** tentar o isolamento do vírus em cultura celular.*

ATENÇÃO: Uma amostra recebida pelo laboratório deve ser acompanhada de informações suficientes para identificar quando, onde e como foi coletada ou preparada. Assim como, quais testes e/ou procedimentos (se houver) devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

ANVISA, 2008- Noções Gerais para Boas Práticas em Microbiologia Clínica (Noções Gerais para Boas Práticas na Microbiologia Clínica (anvisa.gov.br). Acesso em 18 de Agosto de 2020.

CAPITANI C, MAROCCHI A, TOLIO A. Automation of the Pre-Analytical Phase: A Performance Evaluation of Alternative Scenarios. *Journal of the Association for Laboratory Automation, JALA*. 2002;7(2).

COSTA, Vivaldo Gomes da; MORELI, Marcos Lázaro. Principais parâmetros biológicos avaliados em erros na fase pré-analítica de laboratórios clínicos: revisão sistemática. *Jornal Brasileiro de*

Patologia e Medicina Laboratorial, v. 48, n. 3, p. 163-168, 2012.

GARDEZI, Syed Adeel Hussain; IKRAM, Aamer. Application of bio-safety principles in Laboratory Analysis of Clinical Samples from patients with COVID-19. *Laboratory Science*, v. 70, n. 5, 2020.

GONÇALVES, Karla Martins. A importância do controle de qualidade no laboratório de análises clínicas: Uma revisão bibliográfica. 2020.

GUIMARÃES, Alexandre Costa et al. O laboratório clínico e os erros pré-analíticos. *Revista HCPA*. Vol. 31, n. 1 (2011), p. 66-72, 2011.

LIPPI G. Governance of pre-analytical variability: traveling the right path to the bright side of the moon? *Clin Chim Acta*. 2009; 404(1):32-6.

MARTINELLO, Flávia. Biossegurança laboratorial na pandemia do SARS-CoV-2. *A Tempestade do Coronavírus*, v. 52, n. 2, p. 109-16, 2020.

MOTTA, V. T. *Bioquímica clínica para o laboratório*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009.

Organização Mundial da Saúde, 2004. Manual de segurança biológica em laboratório – 3a edição. Disponível em: <<https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebport.pdf?ua=1>>. Acesso em 12 de maio de 2020.

PLEBANI M, LIPPI G. Hemolysis index: quality indicator or criterion for sample rejection? *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(8): 899-902.

6 EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL PARA O DIAGNÓSTICO DA COVID-19

Desde a década de 1960, quando Kurland e colaboradores desenvolveram o primeiro método de purificação e isolamento de RNA por centrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl), essa área tem crescido e avançado para uma ciência moderna e eficaz, dentro da biologia molecular. Por isso novos protocolos para extração de RNA de variadas amostras foram desenvolvidos desde então (VOMELOVA, 2009).

Logo após 1968, Kirky, Later e Chirgwin aperfeiçoaram a extração de RNA usando tiocianato de guanidina, um forte desnaturante, e β -mercaptoetanol (β -met), um agente redutor, em conjunto ou com seguida da extração utilizando etanol ou com ultracentrifugação em CsCl (DETTOGNI & LOURO, 2015). Mais à frente, em 1982, Feramisco e colaboradores descreveram o sucesso da combinação da guanidina com fenol para a extração de RNA (DETTOGNI & LOURO, 2015).

Em consequência às várias desvantagens e baixa reprodutibilidade das técnicas desenvolvidas até então, foram necessários novos aperfeiçoamentos, e em 1987 Piotr Chomczynski e Nicoletta Sacchi publicaram um outro método de extração orgânica com tiocianato ácido de guanidina-fenol-clorofórmio. Em uma única etapa, esse método possibilitou a extração do RNA dentro de 4 horas (DETTOGNI & LOURO, 2015). Por apresentar uma maior agilidade, maior facilidade, sensibilidade, pureza do RNA, reprodutividade e diminuição da

quantidade de amostra necessária, esse método tornou-se o padrão ouro na extração de RNA na época, e passou a ser usado como princípio de muitos reagentes comerciais (WATZINGER, 2006; VOMELOVA, 2009).

A extração de biomoléculas como DNA, RNA e proteínas, predomina como a técnica mais importante usada na biologia molecular. Além disso, se concretiza como ponto de partida para o desenvolvimento de produtos, onde podemos incluir *kits* de diagnóstico (TAN e YIAP, 2009).

Esse ponto de partida envolve a extração de ácidos nucleicos de alta qualidade que viabilizam a técnica e o uso do material biológico (HE et al., 2017). De acordo com o CDC, os kits de extração de RNA da PROMEGA® são uma das opções válidas para uma adequada e correta extração de ácidos nucleicos a partir de amostras respiratórias superiores e inferiores, oriundas de pacientes com suspeita de SARS-CoV-2.

OBJETIVO

Isolar o RNA para detecção de material genético do SARS-CoV-2 (Corona vírus), a partir de secreção de nasofaringe/orofaringe para amplificação por PCR em tempo real.

Materiais e equipamentos necessários

- Reagentes: Maxwell® 48 Viral Total Nucleic Acid (Promega, cat. AS1150);
- Maxwell® 48 Instrument (Promega);
- EasyExtract DNA-RNA;
- Volume de amostra: 200µL de secreção em meio de transporte;
- Descarte infectante;
- Ponteira 200µL e 1000µL;
- Pipetadores 200µL e 1000µL.

AO USAR A CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA, DEVE-SE:

Higienizar com álcool etílico a superfície da cabine, deve-se ligar a lâmpada UV por aproximadamente 15 minutos, a fim de ajudar na descontaminação da superfície de trabalho (a lâmpada UV tem um alarme de segurança que só permite seu funcionamento com o vidro frontal totalmente fechado).

Em seguida, é necessário higienizar o material de trabalho com álcool etílico e acomodar na cabine de segurança para expor a descontaminação com a lâmpada UV por 15 minutos. Após os 15 minutos, o ideal é aguardar mais 5 minutos para estabilizar o fluxo e, ao colocar as mãos na cabine, aguarde 1 minuto para começar o trabalho.

Ao encerrar as atividades é necessário higienizar com álcool etílico os materiais reutilizáveis que tiveram contato com material biológico (por exemplo, micropipetadores) e todo o material infectante deve ser acondicionado para descarte. Por fim, a cabine deve ser higienizada com álcool etílico. Ainda é necessário deixar o fluxo funcionando por 5 minutos para que o equipamento filtre as partículas indesejáveis que ainda estiverem na área de trabalho e após esse tempo é possível deligar a CSB.

6.1 EXTRAÇÃO AUTOMATIZADA COM MAXWELL® RSC 48 INSTRUMENT

Devem estar dentro da cabine de biossegurança os seguintes materiais:

Vórtex; Micropipetas de 200 e 1000 μ L; Ponteiras de 200 e 1000 μ l com barreira*; Criotubos; Etiquetas e canetas; Descarte; Pinça; Microtubo de 1,5mL; Tubos do tipo Falcon; Estantes; Borrifador contendo álcool 70%; Papel toalha; Caixa de luvas.

Observação: a etapa de extração que necessita de manuseio direto com a amostra biológica ativa deverá ser feita na sala de processamento de amostras.

Após alíquotar as amostras dos pacientes nos criotubos de 2mL (Capítulo 5), uma alíquota de 200 μ L da amostra deve ser adicionada a um microtubo de 1,5mL para que seja inativada. Outros 2mL são

adicionados aos criotubos que são repassados à sala de extração de RNA para seu devido acondicionamento em -80°C.

Etapa na sala de processamento de amostras

Pipete 200µL de amostra em um microtubo de 1,5mL. Para inativação viral deve-se adicionar 220µL da solução de lise (200µL do Lysis Buffer e 20µL de proteinase K) na alíquota de 200µL de amostra.

Observação: *A adição dos reagentes desta etapa deve ser feita no momento da inativação.*

Feche os tubos e agite com vigor por 10 segundos. Incube à temperatura ambiente (15–30°C) por 10 minutos. **Incube a 56°C em termobloco** ou banho-maria por **10 minutos**.

NOTA: A preparação da solução de inativação será realizada na sala de extração para entregar à equipe da sala de processamento de amostras

Observação: *Após a incubação, as amostras estão inativadas e prontas para purificação.*

Etapa na sala de extração

Ligue o Maxwell e o tablet. O próprio aparelho faz o autoteste, que dura cerca de 40 segundos. Clique “Sanitize” para esterilizar com UV o equipamento durante 15 minutos no primeiro momento em que o equipamento for ligado ou 1 minuto de UV a cada processo de extração realizada.

Durante os 15 minutos, identifique os tubos de eluição dos pacientes e prepare todo o material na cabine. Coloque os cartuchos a serem usados em *rack* de cartucho Maxwell® 48 LEV (Cat. AS1251) e insira cada cartucho na *rack* com o lado da etiqueta voltado para longe dos tubos de eluição. Pressione o cartucho para baixo para

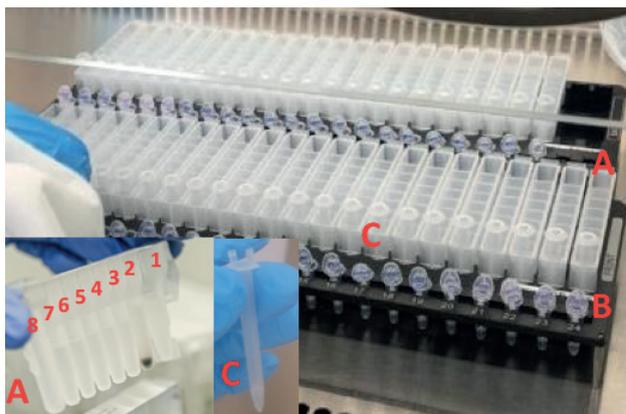
encaixá-lo na posição até ouvir um “click”, o que garantirá que o cartucho está fixo com segurança (Figura 9A).

NOTA: Aliquotar a água RNase free do kit nos microtubos fornecidos pelo fabricante de uma vez.

Posicione os tubos de eluição (devidamente identificados com o número das amostras), acrescidos de 50µL da água livre de nucleases, e os deixe **fechados** até a colocação da plataforma dentro do Maxwell® 48 LEV (Figura 9B). Observe atentamente se o volume de água aliquotado não está espalhado pelo tubo, para evitar comprometimento da extração.

Retire cuidadosamente o selo referente ao poço de amostra e aplique os 420µL da amostra inativada (Figura 9A) no cartucho. Faça esse procedimento para todas as amostras. Os cartuchos são utilizados de forma individual, sendo assim, cada *rack* pode suportar a quantidade de cartuchos a serem utilizados, seja 1 cartucho até 48 cartuchos.

Figura 9 – Ilustração da plataforma (base em preto) preparada para uso. (A) Cartucho da reação (1: poço de colocação da amostra; 2: poço com as esferas magnéticas; 3 a 7: poços de tampão de lavagem; 8: poço para colocação do *Plunger*); (B) Tubos de eluição; (C) *Plunger*



FONTE: A autoria própria.

Antes de passar para próxima etapa, troque de luvas

Depois da aplicação das amostras retire todo o lacre do cartucho com bastante cuidado para evitar respingos nos cartuchos próximos.

Observação: *Verifique se todas as fitas de vedação e qualquer adesivo residual foram removidos, antes de colocar os cartuchos no instrumento.*

Dica: A retirada do lacre na diagonal facilita o processo e diminui a formação de aerossóis.

Antes de passar para a próxima etapa, troque de luvas

Colocar os *plungers* (Figura 9C) no poço nº 8 de cada cartucho. O poço 8 é o poço mais próximo do tubo de eluição. Os *plungers* devem sempre ser manipulados com bastante cuidado e utilizando a parte superior. Se manuseados de forma incorreta podem causar contaminações, então, evite tocar nas pontas dos *plungers*.

Trocar de luvas para abrir os tubos de eluição.

No equipamento, clique START (esse é o comando inicial para que o equipamento direcione o usuário para a escolha dos tipos de extrações que podem ser feitas pelo mesmo). Clique em SELECIONAR O PROTOCOLO (ao bipar o código de barras fornecido em cada *kit* de extração, o equipamento reconhece o tipo de extração e ao mesmo tempo valida a extração a partir do lote do *kit*). Clique então em PROCEED (aqui o tipo de extração já foi escolhido e validado) e selecione OK (nesse momento as portas irão abrir).

Coloque a plataforma no Maxwell devidamente encaixada. Observe atentamente que cada *rack* possui a informação das posições “frente” e “atrás”, para que sejam devidamente colocadas em suas posições no equipamento. Nesse momento os cartuchos já devem estar abertos e com as amostras e os tubos de eluição também abertos com as tampas dos tubos voltadas para fora do equipamento, de forma a garantir que os canais de extração do equipamento sejam inseridos nos cartuchos.

Feche o equipamento no ícone da porta e o processo de extração se iniciará. Todo o processo de extração dura cerca de 30 minutos. Após esse tempo, o equipamento informa o término da operação e solicita a abertura do equipamento para a retirada dos microtubos contendo o RNA e dos cartuchos para descarte. Por fim, é preciso higienizar as *racks* com álcool a 70% e inseri-las de volta no equipamento para a esterilização com UV por 1 minuto.

Observações:

- Para limpeza e higienização do equipamento, utilizar álcool a 70% ao final do dia;
- No caso de queda de energia, é possível religar o equipamento e continuar o procedimento, mas antes deve-se fazer o *Clean up*;
- Tanto o tablet quanto o equipamento precisam estar conectados na tomada.

6.2 EXTRAÇÃO MANUAL COM EASYEXTRACT DNA-RNA

Devem estar dentro de cabines de biossegurança os seguintes materiais:

Vórtex; Micropipeta de 200 μ L; Ponteiras de 200 μ L com barreira*; Criotubos; Etiquetas e canetas; Descarte; Pinça; Microtubo de 1,5mL; Tubos do tipo Falcon; Estantes; Borrifador contendo álcool 70%; Papel toalha; Caixa de luvas.

Toda etapa da extração manual deverá ser feita na sala de processamento de amostras.

Após alíquotar as amostras dos pacientes nos criotubos de 2mL, uma alíquota de 80 μ L da amostra deve ser adicionada a um microtubo de 1,5mL. Outros 2mL são adicionados a criotubos que são entregues à sala de extração de RNA para seu devido acondicionamento em -80°C.

1. Pipete 80 μ L de amostra em um microtubo de 1,5mL;
2. Adicione 20 μ L da solução de Easy Extract na alíquota de 80 μ L de amostra;

3. Feche os tubos e agite em vórtex por 15 segundos;
4. Incube a 95°C por 5 minutos;
5. Resfrie a amostra em banho de gelo antes de prosseguir para a PCR.

NOTA: A extração manual só é realizada em amostras transportadas em PBS.

REFERÊNCIAS

DETTOGNI, R. S.; LOURO, L. D. Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4, p. 940, 2015.

HE, Hui; LI, Rongqun; CHEN, Yi; PAN, Ping; TONG, Wenjuan; DONG, Xueyan; CHEN, Yueming; YU, Daojun. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-8, 23 mar. 2017.

TAN, Siun Chee; YIAP, Beow Chin. DNA, RNA, and Protein Extraction: the past and the present. *Journal Of Biomedicine And Biotechnology*, [S.L.], v. 2009, p. 1-10, 2009.

VOMELOVA, I.; VANICKOVA, Z.; SEDO, A. Methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biologica*. 55(6):243-51, 2009.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*. 27(2-3):254-98, 2006.

7 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE QUANTITATIVA – TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-QPCR) PARA O DIAGNÓSTICO DA COVID-19

A RT-qPCR - Transcriptase Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real, consiste em uma técnica da biologia molecular que identifica e quantifica a carga viral em pacientes na fase aguda da doença, através da detecção do material genético do vírus (RNA viral). Neste método, o RNA é primeiramente transcrito em DNA complementar (cDNA) por transcriptase reversa do RNA total ou RNA mensageiro (mRNA). O cDNA é então usado como modelo para a reação qPCR (BUSTIN S, 2004).

De uma maneira geral, o ensaio de RT-qPCR baseia-se na amplificação de regiões específicas do genoma viral em amostras obtidas do trato respiratório por *swab* oro e/ou nasofaríngeo para a detecção de infecções atuais, tornando-se assim o teste padrão-ouro para o diagnóstico do vírus SARS-CoV-2 (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, 2020; World Health Organization, 2020; LIU et al., 2020; RAMOS et al., 2020).

Sendo assim, esse ensaio permite que os indivíduos infectados sejam identificados e isolados, a fim de reduzir a propagação da infecção viral, além de permitir o rastreamento das taxas regionais e nacionais de infecção para informar às autoridades de saúde pública.

Em termos técnicos, a PCR em tempo real gera um *threshold* (limite) e um ciclo limiar (CT, do inglês: *Cycle Threshold*). O *threshold*

corresponde ao nível de fluorescência, sendo essa maior que o *background* onde a reação é detectada durante a fase exponencial. Já o CT é o ponto em que o produto (fluorescência) cruza um limite pré-determinado (*threshold*) para cada amostra. Sendo assim, quanto maior a quantidade de DNA alvo (sequência a ser amplificada) mais baixo será o CT, pois serão necessários menos número de ciclos à reação para ultrapassar o limiar (TANG, STRATTON, 2006).

Atualmente, os *kits* comerciais trazem *primers* e sondas para os genes **RdRP** (do inglês: *RNA-dependent RNA polymerase*), a fase de leitura aberta **ORF1ab**, **E** (do inglês: *envelope protein*) e **N** (do inglês: *nucleocapsid protein*) do novo coronavírus (BUSTIN & NOLAN, 2020). O Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino (NUPIT-SG), da UFPE, utiliza dois *primers* (N1 e N2) específicos do vírus SARS-Cov-2 para os ensaios da PCR. E, seguindo as recomendações do CDC, o NUPIT-SG considera um valor de CT até 40 como amostra detectável para a presença do vírus. Abaixo segue o protocolo para realização da PCR em tempo real, usando o *kit* IDT – código 002088 – com 03 ensaios para RT-qPCR (N1, N2 e RP), GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (Promega, cat. A6121) e Controles positivos: 2019-nCoV_N Positive Control Kit (clonagem do vírus); Hs_RPP30 Positive Control Kit.

OBJETIVO

Descrever o ensaio de RT-qPCR para a detecção quantitativa do novo coronavírus 2019 (2019-nCoV) em amostras provenientes do trato respiratório (*swabs* para naso e orofaringe).

REAGENTES E SUPRIMENTOS

- O *Kit* de *primers*/sondas utilizado é o *kit* – código 002088- com 03 ensaios para RT-qPCR, contendo *primers* e sondas de hidrólise, publicados pelo CDC e produzidos com a qualidade ISO-13485 da IDT. Esse *kit* detecta separadamente 03 regiões do genoma viral 2019-ncov (N1 e N2) e um controle interno da reação RNase P (RP) (CDC, 2020).
- GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (Promega, cat. A6121). O *kit* contém uma formulação 2X estabilizada com todos os componentes

- para PCR quantitativo (qPCR), pronta para uso, basta adicionar os primers e sonda;
- Controles positivos: 2019-nCoV_N *Positive Control Kit* (clonagem do vírus); Hs_RPP30 *Positive Control Kit*;
 - Água de qualidade molecular, sem nuclease;
 - Barreira para aerossóis P10, P200 e P1000;
 - Tubos de microcentrífuga estéril e isentos de nuclease de 1,5mL;
 - Tiras de 0,2mL para tubos de reação PCR ou placas de reação para PCR em tempo real de 96 poços e tiras ópticas de 8 tampas ou adesivo;
 - Caneta de marcação de laboratório;
 - Prateleiras para tubos de microcentrífuga de 1,5mL.

EQUIPAMENTOS

- Estação de trabalho de PCR com lâmpada UV; fluxo laminar com filtro HEPA classe 1000;
- Misturador vórtex;
- Microcentrífuga;
- Micropipetas (2 ou 10µL, 200µL e 1000µL);
- Gelo ou *ice block*;
- Sistema de detecção por PCR em tempo real.

DESCONTAMINANTES DE SUPERFÍCIE

- DNAZap™;
- DNA Away™;
- RNase Away™;
- 10% de alvejante (dilução 1:10 do hipoclorito de sódio comercial de 5,25-6,0%);

OBSERVAÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

O trabalho de laboratório de diagnóstico não propagativo deve ser realizado em instalações e procedimentos equivalentes ao NB2.

AO USAR A CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA, DEVE-SE:

1. Higienize a superfície da cabine com álcool etílico a 70%;
2. Higienize o material de trabalho com álcool etílico a 70% e acomodar na cabine de segurança;
3. Ligue a lâmpada UV com o material por 15 minutos;
4. Aguarde 5 minutos para estabilizar o fluxo;
5. Após colocar as mãos na cabine, aguarde 1 minuto para começar o trabalho;
6. Ao encerrar as atividades, higienize os materiais reutilizáveis que tiveram contato com material biológico (por exemplo, micropipetadores);
7. Acondicione todo material infectante para descarte;
8. Higienize com álcool etílico a 70% a superfície da cabine, ao concluir;
9. Deixe a cabine funcionando por 5 minutos adicionais para que o equipamento filtre as partículas indesejáveis que ainda estiverem na área de trabalho;
10. Após o período citado acima, desligue o fluxo e encerrar a atividade.

REAÇÃO MASTER MIX E CONFIGURAÇÃO DA PLACA

1. Na estação de Preparo da PCR, após deixar em UV por 15 minutos com a placa e pipetas que serão usadas, coloque o 2X *Master Mix* e o *primers*/sondas em um bloco a frio durante todo o preparo;
2. Descongele a mistura principal de reação 2X e o *primer*/sonda antes de usar;

ATENÇÃO: o Master Mix da Promega exige adição do dye cxr na quantidade de 17 μ L para cada 1mL de Master Mix ou 212,5 μ L para 12,5mL de Master Mix.

3. Misture o 2X *Master Mix* e o *primer*/sondas por inversão 5 vezes;
4. Centrifugue brevemente 2X *Master Mix* e *primers*/sondas e retorne ao bloco frio;

5. Rotule um tubo de microcentrífuga de 1,5mL para cada conjunto de *primers*/sondas (N1, N2, RP);

6. Determine o número de reações (N) a serem configuradas por ensaio. Realize o cálculo com uma margem a mais, para prováveis erros de pipetagem. Use o seguinte guia para determinar N:

a) Se o número de amostras (n) incluindo controles for igual a 1 a 14, então $N = n + 1$;

b) Se o número de amostras (n) incluindo controles for 15 ou superior, então $N = n + 2$;

7. Para cada conjunto de *primers*/sondas, calcule a quantidade de cada reagente a ser adicionado para cada mistura de reação (N = número de reações) (Tabela 3).

Tabela 3 – Relação de reagentes e quantidades para uso em mastermix.

REAGENTES	QUANTIDADE PARA 1 POÇO
GoTaq® Probe qPCR Master Mix, dUTP (2X)	10µL
GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR (50X)	0,4µL
Mix de Primers e sonda 2019-nCoV (IDT)	1,5µL
Água RNase DNase Free	3,1µL
TOTAL	15µL
OBS: 5 µL de RNA	5µL

Fonte: Autoria própria.

8. Distribua os reagentes em cada tubo de microcentrífuga rotulado de 1,5mL. Após a adição dos reagentes, homogeneize as misturas de reação pipetando para cima e para baixo. **Não vortexar**;

9. Centrifugue por 5 segundos para coletar o conteúdo na parte inferior do tubo e, em seguida, coloque o tubo em uma prateleira fria;

10. Instale os tubos ou placas da tira de reação em um rack mais frio de 96 poços;

11. Distribua 15µL de cada mistura principal nos poços apropriados conforme desenho do plano de placa melhor adaptado pela instituição;

12. Antes de passar para a área de manipulação de ácidos ribonucleicos, prepare as reações no *Template Control* (NTC) (A1, A2 e A3) na área de preparação do ensaio;

13. Pipete 5µL de água livre de nuclease nos poços de amostra NTC. Feche bem os poços NTC antes de prosseguir;

14. Cubra toda a placa de reação e mova-a para a área de manuseio de ácido ribonucleico da amostra.

ADIÇÃO DA AMOSTRA

1. Agite no vórtex os tubos de amostra de RNA por aproximadamente 5 segundos;

2. Após a centrifugação, coloque os tubos de amostra de RNA extraídos no *rack* frio;

3. As amostras devem ser adicionadas (coluna 1 - 12, linhas C à F) ao ensaio específico que está sendo testado. Pipete cuidadosamente 5µL da primeira amostra em todos os poços marcados para essa amostra. Mantenha outros poços de amostra cobertos durante a adição;

4. Tampe com segurança a coluna à qual a amostra foi adicionada para evitar contaminação cruzada e garantir o rastreamento da amostra;

NOTA: Troque as luvas quando necessário para evitar contaminação.

5. Repita as etapas 3 e 4 para as amostras restantes;

6. Adicione 5µL de amostra extraída do *Human Specimen Control*

(HSC) aos respectivos poços HSC. Tampe os poços com segurança após a adição;

7. Cubra toda a placa de reação e mova a placa de reação para a área de manuseio do controle positivo.

ADIÇÃO DO CONTROLE

1. Pipete 5µL de RNA nCoVPC para os poços de amostra nos poços 1H, 2H, 3H. Fechar bem os poços após a adição do RNA de controle.

NOTA: Se estiver usando tiras de 8 tubos, identifique a TAB de cada tira para indicar a posição da amostra. NÃO ETIQUETE O TOPO DOS TUBOS DE REAÇÃO.

2. Centrifugue brevemente as tiras do tubo de reação por 10 a 15 segundos. Após a centrifugação, retorne ao rack frio.

NOTA: Se estiver usando placas de 96 poços, centrifugue por 30 segundos a 500g, 4°C.

Quadro 1 – Ciclagem utilizada para o ensaio molecular da RT-qPCR para o diagnóstico da COVID-19.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação	1	45° C	15 minutos
Anelamento	1	55° C	30 segundos
Amplificação	45	95° C	3 segundos

Fonte: Autoria própria.

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após o final da termociclagem, os dados precisam ser salvos para posterior análise dos resultados. As análises devem ser realizadas separadamente para cada alvo e os limites devem ser ajustados para ficar na fase exponencial das curvas de fluorescência e acima de qualquer sinal de fundo.

1. NTCs devem ser negativos e não exibir curvas de crescimento de fluorescência que cruzem a linha do limiar;

- a) Se um falso positivo ocorrer com uma ou mais das reações NTC do iniciador e da sonda, pode ter ocorrido contaminação da amostra;
- b) Invalide a execução e repita o ensaio com uma aderência mais rigorosa às diretrizes do procedimento.

2. A RP (Controle Endógeno Humano) deve ser positiva antes de 40 ciclos para todas as amostras clínicas e HSC. Isso indica a presença de ácido ribonucleico suficiente do gene RNaseP humano e que a amostra é de qualidade aceitável;

- a) Falha na detecção da RNaseP no HSC pode indicar:
 - Configuração e execução inadequadas do ensaio;
 - Mau funcionamento do reagente ou equipamento.
- b) Detecção da RNaseP no HSC, mas falha na detecção da RNaseP em qualquer uma das amostras clínicas pode indicar:
 - Extração inadequada de nucleotídeo de materiais clínicos, resultando em perda de ácido ribonucleico ou transferência de inibidores de PCR de amostras clínicas;
 - Ausência de material celular humano suficiente na amostra para permitir a detecção.

3. O HSC deve ser negativo para conjuntos de primers/sondas específicos para 2019-nCoV;

- a) Se qualquer *primer*/sonda específica para 2019-nCoV exibir

uma curva de crescimento que cruze a linha do limite, interprete da seguinte maneira:

- Contaminação de reagentes de extração de ácido ribonucleico pode ter ocorrido. Invalide a execução e confirme a integridade dos reagentes de extração de ácido ribonucleico antes de mais testes;
- A contaminação cruzada das amostras ocorreu durante os procedimentos de extração de ácido ribonucleico ou a configuração do ensaio. Invalide a execução e repita o ensaio com aderência mais rigorosa às diretrizes do procedimento.

4. Quando todos os controles exibem o desempenho esperado, UMA AMOSTRA É CONSIDERADA NEGATIVA, se todas as curvas de crescimento do limiar do ciclo 2019-nCoV (N1, N2) NÃO ultrapassarem o limite (CT>40) e a curva de crescimento da RNaseP cruzar a linha do limite (CT<40);

5. Quando todos os controles exibem o desempenho esperado, UMA AMOSTRA É CONSIDERADA POSITIVA para 2019-nCoV se todos os marcadores (N1, N2) da curva de crescimento do limiar do ciclo cruzarem a linha do limiar (CT<40). A RNaseP pode ou não ser positiva como descrito acima, mas o resultado 2019-nCoV ainda é válido;

6. Quando todos os controles exibem o desempenho esperado e as curvas CT para os marcadores 2019-nCoV (N1, N2) e o marcador RNaseP NÃO cruzam a curva de crescimento do limite do ciclo (CT<40), o resultado é inválido. O RNA extraído da amostra deve ser re-testado. Se o RNA residual não estiver disponível, extraia novamente o RNA da amostra residual e teste novamente. Se a amostra retestada for negativa para todos os marcadores e todos os controles exibirem o desempenho esperado, o resultado será "Inválido";

7. Quando todos os controles exibem o desempenho esperado e a curva de crescimento do limiar do ciclo para qualquer um ou

dois marcadores (N1, N2), MAS NÃO TODOS OS TRÊS, cruzam a linha do limite, O RESULTADO É INCONCLUSIVO para 2019-nCoV. Volte a extrair o RNA da amostra residual e teste novamente (Figura 10).

Figura 10 – Interpretação de resultados.

2019 nCoV_N1	2019 nCoV_N2	RP	Interpretação dos resultados
+	+	±	2019-nCoV detectado
-	-	+	2019-nCoV NÃO detectado
Apenas uma região positiva		±	Inconclusivo
-	-	-	Resultado Inválido

Fonte: CDC, 2020.

REFERÊNCIAS

BUSTIN, S. A. AZ de PCR quantitativo. FIVEphoton Biochemicals, 2004.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 8, 2020.

CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel; Instructions for Use. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>. Acesso em 12 de maio de 2020.

LIU, R.; YI, S.; ZHANG, J.; LV, Z.; ZHU, C.; ZHANG, Y. Viral load dynamics sputum and nasopharyngeal swab in patients with COVID-19. Journal of Dental Research, 2020.

RAMOS, K. J et al. Detection of Sars-Cov-2 by bronchoscopy after negative nasopharyngeal testing: stay vigilant for COVID-19. Respiratory Medicine Case Reports, 30:101120, 2020

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. 2020. Disponível em: http://www.sbpc.org.br/wpcontent/uploads/2020/03/Nota_EscassezDeReagente_DuranteCOVID-19.pdf. Acesso em 15 de outubro de 2020.

TANG, Y.W.; STRATTON, C.W. Técnicas Avançadas em Microbiologia Diagnóstica. Springer, p. 551, 2006.

8 EMISSÃO DOS LAUDOS: ANÁLISE, CONFERÊNCIA E RASTREABILIDADE DOS DADOS

A etapa final do diagnóstico envolve a análise dos resultados e a liberação dos exames. Com um volume de processamento diário significativo, torna-se um desafio lidar com a quantidade de dados e informações obtidas, assegurando-se o controle de qualidade. Nesse sentido, o NUPIT-SG organizou um fluxo de informações e atividades com a finalidade de sistematizar o trabalho e evitar erros aleatórios ou operacionais.

Assim, todas as etapas que precedem a liberação dos exames são realizadas com pelo menos uma dupla verificação, utilizando um sistema de planilhas que permite a conferência dos dados, a confidencialidade das informações e o rastreamento das amostras.

A fase de conferência consiste na verificação dos dados dos pacientes que constam na identificação do tubo com os dados presentes na lista recebida pelo Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE) e no sistema de Gerenciamento de Ambiente Laboratorial (GAL), uma vez que o NUPIT-SG, na condição de laboratório de campanha, não dispõe de *software* laboratorial próprio para liberação dos exames. Em caso de inconformidades, tais como divergência com o nome do paciente, número do GAL, tubo sem amostra ou com problemas de integridade, entre outras, as mesmas são registradas no caderno de ocorrências, reportadas ao LACEN e retificadas nas

planilhas de trabalho do NUPIT-SG. Com o intuito de garantir a confidencialidade, a segurança e o armazenamento dos dados de profissionais e pacientes envolvidos no diagnóstico, o NUPIT-SG dispõe de mecanismos de *backup* cujo acesso é restrito aos membros da gestão.

Após a conferência dos dados e verificação de possíveis inconformidades, as amostras são aprovadas na triagem do sistema GAL (Figura 11), o que indica o recebimento das mesmas pelo NUPIT-SG. Na plataforma do GAL as amostras passam por ao menos 3 etapas, são elas: (i) aprovação na triagem, (ii) registro do resultado e (iii) liberação do exame.

Outras atividades são possíveis, como a consulta do *status* por exame ou por paciente, bem como a inserção de um novo cadastro e a impressão do laudo (Figura 11). Ao ser admitida no NUPIT-SG, cada amostra recebe um código de identificação interno, o qual em conjunto com outras informações referentes ao paciente e à amostra, são adicionadas nas planilhas de fluxo interno, a fim de assegurar a conferência e rastreabilidade das informações.

O processo de aprovação da requisição na triagem do sistema GAL é simples e intuitivo. Após a conferência dos dados de cada paciente as amostras são selecionadas e aprovadas clicando na barra “APROVAR”. Em caso de problemas que possam impedir a realização do teste, a requisição é devolvida ao LACEN via GAL com a seleção da opção “DESCARTAR” na tela de triagem do GAL.

Figura 11 – Utilização da plataforma do sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL). (A) Barra de acesso à Triagem do sistema GAL; (B) Acesso à Entrada de Resultado, na qual os resultados são inseridos no sistema; (C) Liberação de resultados por paciente ou por exame; (D) Aba para impressões dos laudos emitidos; (E) Barra para consulta de exames.

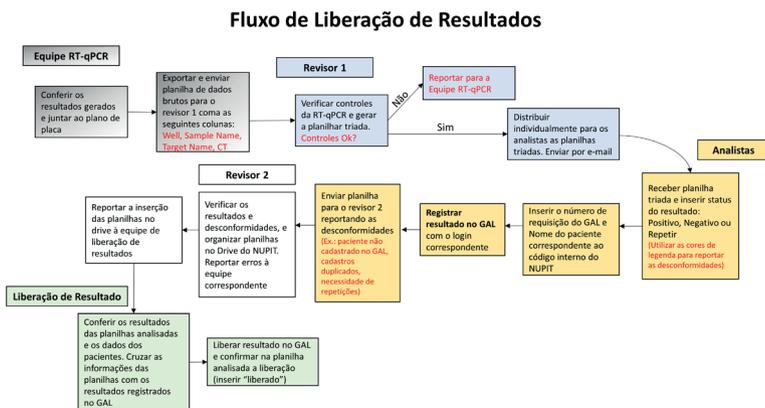


FONTE: Gerenciador de Ambiente Laboratorial (2021).

Uma vez que o exame é processado no NUPIT-SG e as amostras aprovadas na triagem, o cadastro dos resultados é realizado na tela de “ENTRADA DE RESULTADOS” do sistema GAL. Após o cadastro dos resultados, uma nova etapa de conferência é realizada com a finalidade de mitigar erros na liberação dos resultados antes da liberação do laudo pelo sistema GAL. Durante as etapas de cadastro e liberação de resultados, as planilhas de fluxo interno de amostras são utilizadas para garantir a rastreabilidade das amostras e a conferência dos resultados (Figura 11).

Com o término da RT-qPCR, a análise dos dados envolve as etapas esquematizadas na Figura 12. Especificamente, os dados da reação em cadeia de polimerase são exportados em planilha de *Excel* e em seguida enviados para o revisor 1 a fim de verificar se os controles da reação-controles positivos do vírus SARs-COV2, controle RP humano, ambos fornecidos no KIT CDC- Atlanta-EUA, e o controle negativo estão em conformidade com os valores de CT (Figura 12).

Figura 12 – Fluxograma de liberação dos resultados.



FONTE: Elaborado pelo autor (2021).

Caso haja alguma inconformidade, as equipes que realizam a RT-qPCR são rapidamente acionadas para correção do problema ou repetição do teste. Uma vez finalizada a revisão 1, os dados são encaminhados para os analistas, os quais realizam a verificação dos valores de CT de todas as amostras da placa para determinação do *status* do exame (positivo, negativo ou repetição).

Segundo a interpretação dos resultados sugerida no *Kit* CDC, os analistas preenchem a planilha modelo, onde deve constar o código interno, o número de requisição do exame e o nome de cada paciente. Por fim, realizam o cadastro do resultado no sistema GAL, sinalizando alguma possível inconformidade ao revisor 1.

Em seguida, a planilha preenchida pelo analista é enviada para o revisor 2, o qual faz a verificação dos resultados, a organização e inserção das planilhas no *Drive*. As planilhas disponibilizadas no *Drive* são então revisadas pela equipe de análise e liberação dos exames, a qual deve verificar a conformidade entre as informações contidas nas planilhas com aquelas cadastradas no GAL antes da liberação dos exames.

Além da disponibilização dos laudos via sistema Gal, os resultados dos exames realizados no NUPIT-SG são incluídos como parte de relatórios, boletins e artigos científicos com a finalidade de que a divulgação das informações tenha utilidade social para elaboração

de estratégias e esforços no enfrentamento da COVID-19 (Quadro 2).

Quadro 2 – Interpretação de resultados gerados pelo Kit de diagnóstico do CDC.

2019 nCoV_N1	2019 nCoV_N2	RP	Interpretação dos resultados
+	+	±	2019-nCoV detectado
-	-	+	2019-nCoV NÃO detectado
Apenas uma região positiva		±	Inconclusivo
-	-	-	Resultado Inválido

Fonte: Painel de diagnóstico de RT-PCR em tempo real CDC 2019-Novel Coronavírus (2019-nCoV) (2021).

REFERÊNCIAS

Gerenciador de Ambiente laboratorial 2021. Disponível em: www.gal.saude.pe.gov.br/gal/laboratorio/. Acesso em 08 de Dezembro de 2020.

Painel de diagnóstico de RT-PCR em tempo real CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV), p. 39. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download> . Acesso em 22 de janeiro de 2021.

9 PLANO DE RESPOSTA A EMERGÊNCIAS / INCIDENTES

Mesmo ao realizar trabalhos de baixo risco e após todos os requisitos básicos de biossegurança, os incidentes ainda podem ocorrer. Reduzir a probabilidade de exposição/liberação de agente biológico ou para reduzir as consequências de tais incidentes, deve ser desenvolvido um plano de contingência que forneça Protocolos Operacionais Padrão (POPs) específicos a serem seguidos em possíveis cenários de emergência, que se aplicam ao trabalho local e ao meio ambiente. A equipe deve ser treinada nesses procedimentos e devem ocorrer treinamentos periódicos de atualização para manter a competência.

1. Kits de primeiros socorros – devem estar disponíveis e facilmente acessíveis, incluindo suprimentos médicos, como lavagens oculares e ataduras. Os *kits* devem ser verificados rotineiramente para garantir que os produtos estejam dentro da validade de uso e em quantidade suficiente.

*Todos os incidentes devem ser relatados às autoridades pessoais em tempo hábil. Um **registro escrito de acidentes e incidentes** deve ser mantido, de acordo com regulamentos nacionais, quando aplicável.*

2. Kits de derramamento – devem estar disponíveis e facilmente acessíveis, incluindo desinfetantes. Dependendo do tamanho, localização, concentração e/ou volume do derramamento, diferentes protocolos podem ser necessários. Procedimentos escritos para limpeza e descontaminação de derramamentos devem ser desenvolvidos para o laboratório, seguidos de treinamento adequado à equipe.

3. Formação de aerossóis potencialmente infecciosos (fora de uma CSB) – Todas as pessoas devem evacuar a área afetada e as que tenham sido expostas devem ser encaminhadas a um médico. O supervisor do laboratório e o responsável da segurança biológica devem ser informados imediatamente. Ninguém deve entrar na sala durante um espaço de tempo mínimo apropriado (por exemplo, 1 hora), para permitir a evacuação dos aerossóis e o depósito das partículas mais pesadas. Se o laboratório não tiver um sistema central de exaustão do ar, a entrada deve ser retardada, por exemplo, por 24 horas. Devem colocar-se sinais indicando que a entrada é proibida. Após este prazo, a descontaminação deve continuar controlada pelo responsável da segurança biológica. Deve-se utilizar roupa de proteção apropriada e proteção respiratória.

4. Quebra de tubos contendo material potencialmente infeccioso dentro de centrífugas que não têm recipientes estanques – Se ocorrer ou se suspeitar-se de uma quebra enquanto a máquina está em funcionamento, deve-se parar o motor e deixar a máquina fechada durante em torno de 30 minutos, para permitir o depósito do material. Se a quebra for descoberta quando a máquina parar, deve-se a fechar a tampa imediatamente e esperar cerca de 30 minutos. Nos dois casos, o responsável da segurança biológica deve ser informado. Para todas as operações seguintes deve se utilizar luvas resistentes (por exemplo, de borracha espessa) e cobertas, se necessário, por luvas descartáveis. Para retirar restos de vidro, deve se utilizar pinças guarnecidas ou não de algodão. Todos os tubos partidos, fragmentos de vidro, recipientes e o rotor devem ser colocados num desinfetante não-corrosivo cuja eficácia contra o organismo implicado seja conhecida. Os tubos intactos e arrolhados podem ser colocados em desinfetante num recipiente separado e depois recuperados. A cuba da centrífuga deve ser esfregada com o mesmo desinfetante, numa diluição apropriada, esfregada de novo, lavada com água e, finalmente, seca. Todos os materiais utilizados na limpeza devem ser considerados como resíduos infecciosos.

5. Processo de limpeza de derrames – No caso de derrame de material infeccioso ou potencialmente infeccioso, deve-se utilizar o seguinte processo de limpeza:

- a) Utilize luvas e vestuário protetor, incluindo, proteção para a face e os olhos;
- b) Para não deixar espalhar, cubra o derrame com toalhas de papel ou de pano;
- c) Deite um desinfetante apropriado sobre as toalhas de papel e a área circundante;
- d) Aplique o desinfetante de forma concêntrica, principiando pelo exterior da área do derrame e avançando para o centro;
- e) Depois de um período mínimo apropriado (por exemplo, 30 minutos), retire os materiais. No caso de haver vidro partido ou outros objetos cortantes, utilize um apanhador ou uma pinça para recolher o material e colocá-lo num recipiente resistente para eliminação;
- f) Limpe e desinfete a área do derrame (se necessário, repetir os passos 2 - 5);
- g) Descarte os materiais contaminados em um recipiente de resíduos contaminados.

10 DIRETRIZES DO CONTROLE DA QUALIDADE PARA A EXECUÇÃO DO DIAGNÓSTICO DA COVID-19 NO NUPIT-SG

Visto que o NUPIT-SG vem executando o diagnóstico molecular da COVID-19 e exercendo dessa forma a função de laboratório de análises clínicas, torna-se necessária a adoção de determinadas normas de biossegurança e controle de qualidade contidas em normativas de referência nacional.

As normas seguidas estão de acordo com a portaria nº 3.204:2010/MS, a qual descreve norma técnica de biossegurança para laboratórios de Saúde Pública; a RDC 302: 2005/ANVISA/MS, que dispõe sobre regulamento técnico de funcionamento de laboratórios clínicos; e a ABNT NBR ISO 15189:2015, a qual especifica os requisitos para a competência e qualidade que são específicos para laboratórios clínicos.

A adoção das normas de biossegurança e controle da qualidade visam otimizar o trabalho executado no laboratório, garantindo segurança, agilidade e eficiência na liberação dos laudos aos pacientes, sem haver perda da confiabilidade dos resultados ou riscos aos profissionais envolvidos em todas as etapas do diagnóstico. Também tem por objetivo garantir a rastreabilidade de possíveis problemas no fluxo, permitindo assim a rápida solução das eventualidades e possíveis indicações de treinamentos/reciclagens.

A confecção e constante atualização de um manual geral, dos procedimentos operacionais e instruções de equipamento e trabalho

visam garantir a manutenção da qualidade e o aperfeiçoamento das atividades técnicas executadas, sem haver perda de etapas cruciais que possam influenciar nos resultados dos exames ou até na segurança dos profissionais.

Este capítulo está dividido em três sessões, as quais descrevem os requisitos adotados pelo NUPIT-SG a nível de DIREÇÃO, TÉCNICOS e de BIOSSEGURANÇA. Adequações estruturais e de fluxograma realizadas, bem como as atribuições e responsabilidades estão descritas.

10.1 REQUISITOS DA DIREÇÃO

Cadastro no RPELAB

Conforme recomenda a portaria SES Nº 74 de 21 de fevereiro de 2019, o NUPIT-SG está devidamente cadastrado na Rede Pernambucana de Laboratórios (RPELAB). O laboratório se compromete a realizar a atualização do cadastro anualmente ou sempre que necessário.

Implantação da política da qualidade

Para que uma política da qualidade fosse implantada no NUPIT-SG, e para cumprir parte das exigências desse processo de acordo com as normativas, foi formada uma comissão de gestão da qualidade, composta inicialmente por quatro componentes, todos com formação de ensino superior e pós-graduação em áreas afins. A comissão formada sempre deverá possuir integrantes que possuam experiência de gestão da qualidade, bem como conhecimento técnico sobre o fluxograma do(s) diagnóstico(s) realizado(s).

Os integrantes desta comissão possuem a missão de implementar exigências estabelecidas pelas normativas de referência (RDC 302: 2005/ANVISA/MS e ABNT NBR ISO 15189:2015), bem como informar e treinar novos profissionais, garantindo assim a continuidade do processo de qualidade, bem como a sua atualização e aprimoramento. Também devem se comprometer na manutenção dos processos já implementados e, ainda, providenciar melhorias, ajustes, substituições, atualizações e reciclagens necessárias.

Como exigência da normativa referente à implementação da biossegurança, a comissão precisa monitorar a correta execução dos processos que envolvam risco biológico ou riscos de quaisquer origens

e ainda a correta identificação dos locais e objetos que apresentem riscos. Adicionalmente, precisam garantir, por meio de comunicação com as partes responsáveis, o suprimento dos EPIs e Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs) para toda a equipe envolvida.

Finalmente, fica também sob responsabilidade da comissão da qualidade a elaboração e atualização dos POPs, Instruções de Equipamento (IEs) e Instruções de Trabalho (ITs), além dos formulários da qualidade.

Organograma

A estrutura hierárquica do NUPIT-SG apresenta-se da seguinte maneira: diretor(a); coordenador(a) geral; supervisores; analistas; revisores de laudo; técnicos para a execução do diagnóstico; volantes.

A direção deve participar de reuniões com representantes do poder público, apresentar os dados epidemiológicos atualizados da COVID-19 obtidos na instituição (a partir de boletins epidemiológicos), captar recursos para a aquisição de insumos e equipamentos, bem como para a providência de contratos e realizar a seleção e capacitação de profissionais para compor a equipe do diagnóstico. Adicionalmente, a direção também deve supervisionar as atividades da coordenação geral.

A coordenação geral deve supervisionar as atividades gerais executadas no NUPIT-SG, em especial relacionadas aos controles intra- e interlaboratoriais, monitorar o abastecimento de insumos de biossegurança e reagentes em conjunto com os supervisores, verificar a implementação do sistema de gestão de qualidade, coordenar a elaboração de notas técnicas e garantir a comunicação entre NUPIT-SG e o LACEN-PE para alinhar decisões e definições no fluxo diagnóstico.

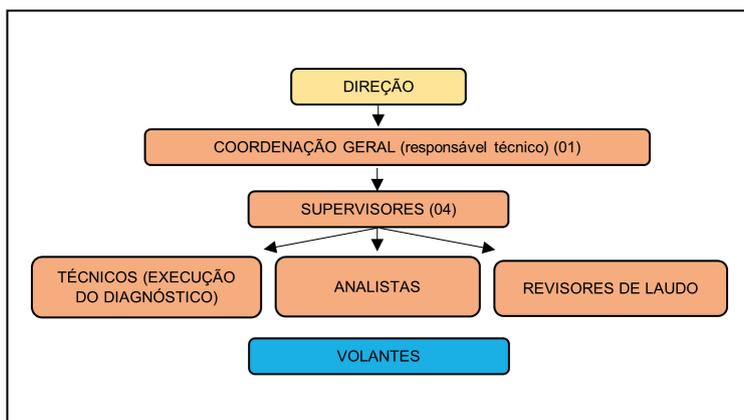
Os supervisores devem reportar e solucionar, junto com a equipe técnica e de analistas, as ocorrências do dia, comunicando à coordenação geral e à direção (caso necessário) as atitudes tomadas e os possíveis ajustes e planos de ação executados, para que assim as recorrências sejam evitadas. Também devem analisar a execução do trabalho da equipe técnica, receber e organizar, junto com a equipe responsável pelo almoxarifado, os insumos comprados/recebidos e ainda garantir a ordem e a organização geral das salas de convivência e laboratórios.

Os técnicos responsáveis pela execução do diagnóstico devem exercer, respeitando o horário e os dias pré-definidos, suas

respectivas funções/atribuições, que são divididas em recebimento e processamento das amostras, extração de RNA e execução da RT-qPCR. Também devem preencher os formulários que fazem parte da gestão da qualidade, tais como registro de temperaturas e uso de equipamentos. Devem ainda garantir a organização e limpeza dos respectivos laboratórios, solicitando, caso necessário, o auxílio da equipe de limpeza terceirizada contratada. Finalmente, devem reportar possíveis problemas nos freezers, geladeiras e equipamentos de uso no diagnóstico.

Os analistas devem realizar a triagem dos dados brutos recebidos pela equipe responsável pela RT-qPCR, sinalizar as repetições necessárias e enviar as planilhas com os dados já triados para a equipe de cadastro dos resultados. Os revisores de laudo, por sua vez, devem realizar a dupla checagem dos registros realizados pelos analistas, preencher a planilha de fluxo presente no *Drive* compartilhado, e finalmente liberar os laudos no sistema informatizado (GAL), sempre conferindo com as informações contidas nas planilhas. Também precisam realizar um contínuo monitoramento do fluxo para rastrear amostras com liberação ou repetição pendentes (Organograma 1).

Organograma 1 – Organograma do NUPIT-SG.



FONTE: Autoria própria.

Controle de documentação interna, externa e obsoleta

Para garantir a rastreabilidade da documentação recebida, bem como das notas técnicas e ofícios gerados pelo NUPIT-SG, uma pasta específica em um *Drive* (de acesso restrito) foi criada com finalidade de armazenamento em nuvem. Um formulário contendo a lista dos documentos exigidos pelo sistema de gestão da qualidade (lista mestra) foi elaborado e nele existe um campo onde são informadas as datas de aprovação, de revisão, bem como o número da revisão e o responsável. Essas datas garantem que haja o rastreamento dos formulários obsoletos, assim impedindo a utilização e garantindo a realização da atualização periódica dos POPs, IEs e ITs.

A disponibilidade de toda a documentação no *Drive* garante o acesso sempre que preciso por todos os envolvidos no diagnóstico.

Avaliação periódica de fornecedores de serviços e suprimentos

Dentre as responsabilidades da coordenação geral está a aquisição de serviços, equipamentos, reagentes e suprimentos. Para tal, é necessário primeiramente que haja a sinalização da necessidade, feita pelos técnicos em cada setor, que é então comunicada aos supervisores. Todas as compras de reagentes e suprimentos são realizadas após uma avaliação prévia dos fornecedores externos. Essa avaliação tem por objetivo garantir melhor negociação de preço, maior qualidade do produto adquirido e menor prazo de entrega.

Devido à alta demanda mundial do uso de insumos para o diagnóstico da COVID tem-se notado uma escassez de vários produtos, o que resulta em alta dos preços e maior tempo na entrega. Diante dessa realidade, o NUPIT tem uma equipe voltada para solicitar a cotação frente a mais de uma empresa e a depender da avaliação/valor, realizar a aquisição e cobrar o cumprimento dos prazos.

Além disso, a aquisição de serviços e equipamentos permanentes é feito respeitando os trâmites legais segundo o órgão regulador, a saber, a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Universidade Federal de Pernambuco (FADE). Os passos a serem seguidos são os seguintes: envio dos orçamentos pelas empresas referente ao produto indicado anteriormente no projeto de pesquisa para à FADE; avaliação do quadro de apuração pela equipe técnica do NUPIT; indicação de compra perante à FADE e aprovação da compra. O recebimento de todos os serviços e equipamentos adquiridos são acompanhados pela equipe interna do NUPIT.

Registro das reclamações e não conformidades

As não conformidades e reclamações precisam ser registradas formalmente em formulários específicos, para que assim possam ser executadas as ações necessárias à resolução dos ocorridos. Um formulário para o monitoramento das não conformidades em amostras biológicas foi elaborado com o intuito de dar uma devolutiva aos municípios ou laboratórios quanto ao correto envio de espécimes clínicos. Neste mesmo formulário, é registrada a ação de tratamento da não conformidade.

Procedimentos para o tratamento das não conformidades em amostras biológicas

Os procedimentos adotados para o tratamento de cada uma das não conformidades observadas na rotina do laboratório quanto às amostras biológicas recebidas, são descritos a seguir.

- a) *Amostras com identificação ilegível*: caso não seja possível identificar o paciente a partir da etiqueta contida no tubo, a amostra deverá ser descartada e o exame descartado no GAL com a respectiva justificativa;
- b) *Amostras em meio de transporte inadequado*: caso o meio de transporte líquido esteja com aparência distinta da comumente observada (cor ou aspecto estranhos), uma observação deverá ser inserida na planilha compartilhada (processamento de amostras_dd.mm.aaa);
- c) *Amostras extravasadas dentro do isopor de transporte*: todas as amostras potencialmente contaminadas devem ser descartadas, bem como os respectivos exames no GAL.
- d) *Tubos rachados*: caso o tubo contendo a amostra esteja rachado ou com alguma avaria aparente, a amostra deve ser descartada, bem como o respectivo exame no GAL;
- e) *Tubo Falcon inadequado para o transporte da amostra biológica*: a amostra poderá ser processada em caso de não haver extravasamento, porém o município deverá ser notificado quanto ao uso do Falcon, com o intuito de haver a substituição do tipo usado;

- f) *Tubos sem swab de nasofaringe ou sem meio líquido de transporte:* caso o tubo venha sem *swab* ou sem o meio de transporte, a amostra deve ser descartada, bem como o respectivo exame no GAL;
- g) *Amostras que não constam o nome na lista de pacientes enviados:* o nome poderá ser inserido na lista com o código atribuído na sala de processamento, desde que a etiqueta contida no tubo esteja legível;
- h) *Nomes que constam na lista enviada, porém sem amostra enviada:* o exame deverá ser descartado no GAL, especificando-se o motivo do descarte;
- i) *Nomes duplicados na lista enviada:* observar, antes de realizar a correção na planilha, se há algum paciente faltando (amostra recebida sem o nome na planilha);
- j) *Dois tubos de um mesmo paciente:* verificar se foram duas coletas realizadas em momentos diferentes; caso não, verificar o nome do local de origem escrito no tubo ou alguma informação que auxilie a diferenciação. Caso não seja possível a diferenciação, o tubo deve ser descartado, bem como o exame no GAL.

Na planilha compartilhada (processamento de amostras_dd.mm.aaa) presente no *Drive*, deverão ser inseridas quaisquer informações que possam ajudar na rastreabilidade de problemas envolvendo os resultados dos exames. Nesta planilha constam os nomes dos pacientes recebidos no dia, e ao lado, são inseridas as observações pertinentes para cada amostra.

O formulário de não conformidades (FORMULÁRIO N°5 – MONITORAMENTO DAS NÃO CONFORMIDADES EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS) deverá ser preenchido sempre que cabível, e a devolutiva para o município ou laboratório também precisará ocorrer sempre que necessário, a fim de evitar a persistência do problema em questão.

10.2 REQUISITOS TÉCNICOS

Recursos humanos e qualificação

A equipe do NUPIT-SG é formada por um corpo técnico-científico

especializado para o desenvolvimento correto das atividades propostas. São ao todo, 40 profissionais divididos em 07 setores de acordo com as atividades realizadas, todos esses subordinados à coordenação geral e direção. Mediante necessidade, a equipe é comunicada e treinada acerca de atualizações de protocolos.

Estão envolvidos na execução das atividades alunos de graduação dos cursos de Biomedicina, Ciências Biológicas e Farmácia, alunos de pós-graduação (mestrado e doutorado), pós-doutorandos e professores da UFPE.

Instalações do laboratório e adequações às atividades executadas

Para o recebimento das amostras de *swab* a serem submetidas ao diagnóstico da COVID-19, o NUPIT-SG possui uma recepção específica, onde profissionais envolvidos na organização geral recolhem o material enviado do LACEN-PE ou dos municípios do Estado. O isopor ou caixa térmica são então entregues aos técnicos na sala de processamento 1.

Para a execução do diagnóstico molecular, o NUPIT-SG dispõe de uma sala de processamento, a qual é subdividida em dois espaços (Processamento 1 e 2), uma sala de extração e uma sala de pré-PCR 1 e 2, sendo a pré-PCR 1 a sala de preparo do *master mix* da PCR e plaqueamento, e a sala pré-PCR 2 é a sala de aplicação das amostras já extraídas.

Todas as salas possuem uma antessala onde os profissionais realizam a paramentação, para que assim possam entrar em segurança no ambiente potencialmente infectado (porta exclusiva para entrada de pessoal). EPIs como macacão de segurança biológica, avental, luvas, máscara, touca e propé estão sempre disponíveis para o uso. Todas as salas também possuem janelas de comunicação para o recebimento e entrega de amostras a processar/processadas, bem como de insumos.

Para a sala de processamento, devido ao alto risco de contaminação, há uma sala específica para a desparamentação dos profissionais, com lixeiras e pia para lavagem das mãos. Ao se desparamentar, os profissionais devem se retirar do local a partir de uma porta exclusiva de saída de pessoal. As salas de processamento também possuem luz UV, a qual é mantida ligada por ao menos 15 minutos, sempre que se finaliza o expediente.

Todas as salas do NUPIT-SG possuem iluminação adequada, bem como são climatizadas, tendo a temperatura e a umidade ambiental monitoradas diariamente. Lixeiros com identificação de risco biológico estão posicionados em todos os ambientes.

As salas de pré-PCR 1 e 2 estão estrategicamente localizadas (distantes da sala de processamento), de tal forma que a sala de preparo do *mix* seja a mais limpa, garantindo uma menor chance de contaminação, principalmente dos reagentes.

Controle de acesso a áreas restritas

Em todas as portas de seus laboratórios, o NUPIT-SG insere identificação, contendo o nome do laboratório ou da atividade executada, bem como se é uma área de acesso restrito à equipe executora do diagnóstico e/ou de limpeza e, ainda, se é de risco biológico. Seguranças controlam o acesso de pessoas externas ao NUPIT-SG, dificultando assim o acesso indevido a áreas que apresentem risco ou que contenham equipamentos ou documentos sigilosos.

Monitoramento, controle e registro de condições ambientais

Em todas as salas de execução do diagnóstico, existem termo-higrômetros que registram a temperatura e a umidade do ambiente, assim como a variação ao longo do dia. Um formulário específico é preenchido diariamente (FORMULÁRIO Nº2 - MONITORAMENTO DE TEMPERATURA E UMIDADE AMBIENTAL), no início e no final do expediente, com as informações de temperatura pontual, máxima e mínima, assim como a umidade pontual, máxima e mínima.

Ao final de cada mês, o formulário preenchido é arquivado e um novo é colocado próximo ao equipamento de monitoramento. Caso haja uma variação elevada das condições especificadas para cada sala, deve-se abrir uma ação corretiva, com o intuito de verificar e solucionar o problema.

Identificação dos equipamentos e lista mestra

Todos os equipamentos são identificados com um código. Este código está presente nos equipamentos em forma de etiqueta, seguindo uma lógica alfanumérica (por exemplo, para os quatro

termocicladores presentes na sala de PCR – TC01 a TC04). Para cada sala, é mantida uma lista mestra de equipamentos, que deve se manter sempre atualizada. Na lista mestra estão informações como código, nome do equipamento, modelo/marca, número de série, tombamento (quando aplicável), periodicidade de manutenção preventiva etc. As listas mestras são mantidas dentro da pasta de documentos da qualidade, no *Drive* compartilhado de uso restrito.

Procedimento de proteção, confidencialidade e backup dos dados

Todos os pacientes recebem um código interno inequívoco para garantir a confidencialidade dos dados e da identidade nos documentos gerados. As listas com os nomes dos pacientes, os arquivos contendo os dados brutos e os resultados são acessados apenas por pessoal autorizado, a partir de *login* e senha. Em relação ao *backup*, há um computador específico para o arquivamento dos documentos, com acesso restrito. Adicionalmente, a cada 15 dias as planilhas de consulta e de fluxo, contendo os dados e a identificação dos pacientes, são enviadas para três e-mails institucionais diferentes, de pessoal autorizado do NUPIT.

Registro de aquisição, recebimento, armazenamento, controle de estoque/validade de kits

O controle de estoque é considerado uma das atividades mais relevantes na gerência do laboratório de análises clínicas, visto que a maioria dos laboratórios dependem da logística do setor do estoque para o seu funcionamento. Portanto, o controle do estoque é um recurso utilizado na gestão laboratorial com o objetivo de organizar os materiais disponíveis, catalogar todos os insumos, além de auxiliar no planejamento de compras, impedindo assim a falta dos insumos ou o excesso deles.

Para um ótimo controle do estoque recomenda-se a realização do inventário periódico, um processo de listagem de todos os insumos armazenados no estoque. Esse processo visa ajudar na organização e planejamento. Em seguida, é recomendada a contabilização do inventário (contagem de todos os itens em estoque) e, posteriormente, a catalogação de todos os insumos identificados. Para a realização do inventário é necessário usar uma planilha dinâmica.

O monitoramento da entrada e saída dos insumos está intimamente relacionado com a elaboração do inventário. A maneira mais prática para realizar esse processo é utilizar a lista de últimas compras como base, o que impedirá a compra excessiva por engano ou a falta de insumos durante os procedimentos.

Controle do estoque para o diagnóstico de SARS-Cov-2 (COVID-19)

O controle de estoque para o diagnóstico da COVID-19 é muito dinâmico, visto que a aquisição, recebimento, armazenamento e consumo dos insumos são frequentes, devido à alta demanda pelo teste para o diagnóstico de SARS-Cov-2.

Para facilitar o monitoramento da entrada, saída e aquisição dos insumos foi criada uma planilha dinâmica no *Excel*, onde todos os produtos foram cadastrados com o código específico, o nome, a marca e a definição de estoque mínimo e máximo para cada produto. Ademais, foi criada uma ficha, com o código, o nome, a marca e a quantidade consumida no dia para o monitoramento diário da saída dos produtos consumidos com mais frequência.

A aquisição dos insumos é frequentemente realizada com base no estoque mínimo de cada produto. Para economizar na aquisição dos insumos, geralmente, são solicitadas pelo menos três cotações de diferentes fornecedores para cada item. Para isso, utiliza-se uma planilha com nome dos fornecedores, dos produtos cotados e os valores monetários.

O recebimento do insumo comprado é realizado mediante a conferência do nome e a quantidade do produto em nota fiscal apresentada no momento da entrega, abrindo-se em seguida a caixa para checar e contabilizar o produto contido. Esse procedimento é realizado com o objetivo de evitar o recebimento de produto incompleto. Para facilitar o rastreo dos produtos não encontrados após a entrega, foi criada uma ficha com a data, nome e a quantidade do produto e nome da pessoa que recebeu o produto no dia.

O armazenamento correto também contribui para bom controle do estoque. Três salas (almoxarifados) foram disponibilizadas para o armazenamento dos insumos comprados para o diagnóstico da COVID-19, além de equipamentos adequados para armazenamento de produtos, como *freezers* e geladeiras. Todos os itens presentes nas salas foram organizados de acordo com as indicações dos fabricantes para garantir a segurança e a qualidade do uso (controle de

temperatura, umidade, restrição à luminosidade, dentre outras condições). Em seguida, os produtos são catalogados para facilitar a sua rápida identificação.

Registro de uso e limpeza dos equipamentos

Um formulário específico para controle da limpeza dos equipamentos foi confeccionado (FORMULÁRIO N° 9 REGISTRO DE USO E HIGIENIZAÇÃO DE EQUIPAMENTO), devendo ser colocado junto a cada equipamento para o registro do uso e da limpeza. O profissional deve preencher as informações do equipamento no cabeçalho, informar o mês e inserir, a cada uso, o período de utilização, o nome e as observações, caso necessário.

Documentação dos procedimentos analíticos

O laboratório dispõe de POPs para todos os técnicos envolvidos na execução do diagnóstico, impressos no laboratório e em pasta do *Drive* compartilhada. POPs do passo a passo da PCR e dos procedimentos de extração foram construídos.

IEs também se encontram disponibilizadas para toda a equipe, impressas junto a cada equipamento, bem como em pasta do *Drive* compartilhado. As seguintes IEs estão disponíveis: termoblocos, centrífugas, cabines de fluxo laminar e termocicladores (QuantStudio e StepOne™ Plus).

Todos os documentos foram revisados, aprovados pela coordenação e referendados pela direção.

Controle de qualidade interno

A cada três meses, um total de 12 amostras de *swab* de nasofaringe devem ser processadas por 3 dias consecutivos ou dentro de uma mesma semana, com a finalidade de avaliar a reprodutibilidade inter-observador e comparar as diferentes equipes envolvidas no processamento, extração e qPCR.

As amostras são previamente separadas e devem englobar 6 amostras positivas e 6 amostras negativas.

Após a obtenção dos resultados, deve-se realizar o cálculo do coeficiente de *kappa* (de acordo com o modelo abaixo) e analisar o nível de concordância obtido. Valores de *kappa* abaixo de 0,61 indicarão

necessidade de melhorias ou correções no processo analítico. O modelo para o cálculo do coeficiente de kappa pode ser encontrado: <<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>>.

Paralelamente, uma das equipes envolvidas deve realizar (dentro da mesma semana) um total de 20 repetições de uma mesma **amostra positiva** (incluindo a extração), a fim de investigar a reprodutibilidade intra-observador. Um percentual de concordância abaixo de 80% implicará em uma investigação de possíveis interferências no processo analítico.

Controle de qualidade externo

O NUPIT-SG deverá enviar, trimestralmente, um total de 24 amostras de secreção de nasofaringe para o laboratório de referência no diagnóstico molecular da COVID-19, o LACEN-PE. Destas 24 amostras, 12 deverão ser positivas e 12 negativas. Assim, o laboratório avaliador poderá determinar o percentual de concordância, bem como o valor do coeficiente de *kappa*, e dessa maneira gerar um relatório de avaliação do laboratório que deverá ser entregue ao NUPIT-SG (serão 4 relatórios ao ano).

10.3 REQUISITOS DE BIOSSEGURANÇA

Os requisitos essenciais em biossegurança devem ser cumpridos a fim de se evitar acidentes que envolvam não apenas a equipe técnica envolvida no diagnóstico, mas também qualquer indivíduo externo. Além disso, o cumprimento integral das normas visa evitar acidentes e contaminações ambientais, de qualquer natureza, preservando a fauna e a flora contida nos entornos da instituição.

Registro de lavagem e esterilização

Diariamente, materiais de reutilização são lavados e esterilizados por meio de autoclave (calor úmido) ou forno (calor seco). Como exemplo, os macacões de proteção biológica que são utilizados pela equipe são reutilizados apenas após processo de esterilização. O registro deve ser feito em formulário específico (FORMULÁRIO N°13 – REGISTRO DE LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS).

Registro de controle de pragas e roedores

Periodicamente o NUPIT-SG passa por um processo de dedetização, evitando assim o surgimento de formigas, baratas, cupins ou outros insetos que possam comprometer a segurança do ambiente e levar contaminantes para outros locais. A cada aplicação do inseticida por empresa terceirizada, um documento comprovando a execução do procedimento precisa ser emitido, sendo então arquivado e ficando sob a responsabilidade da coordenação.

Fornecimento de EPIs

São distribuídos, diariamente, um número suficiente de EPIs para toda a equipe envolvida no diagnóstico. A quantidade distribuída é sempre excedente, para casos de necessidades especiais e imprevistos. Ao final de cada dia, os armários são realimentados com as quantidades adequadas de cada EPI, dessa forma garantindo o acesso rápido às equipes que iniciam cedo as suas atividades.

Treinamento periódico em biossegurança

Além dos avisos, advertências e instruções básicas de biossegurança presentes nos laboratórios do NUPIT-SG, toda a equipe realiza um treinamento quanto às condutas de biossegurança antes de iniciarem seu trabalho no diagnóstico da COVID-19. Nesse treinamento, deixa-se clara a importância do uso correto de todos os EPIs, do registro e comunicação de possíveis incidentes, do fluxo de entrada e saída dos laboratórios, da paramentação e desparamentação, e do correto manuseio dos equipamentos e das amostras biológicas. Sempre que necessário, uma reciclagem com os envolvidos no diagnóstico é realizada, com o fim de evitar reincidências.

Sinalização para a identificação de risco

Todas as salas relacionadas ao diagnóstico da COVID-19 possuem avisos em suas portas quanto ao risco biológico daquele ambiente. O símbolo de risco biológico está presente também nas janelas de comunicação entre as salas, nas antessalas e ainda nos recipientes de descarte de material contaminado. Lixeiros destinados ao

descarte de material infectante possuem sacos brancos com a identificação/símbolo do risco biológico.

Além de cumprir com todas as necessidades de identificação de risco biológico, o NUPIT-SG possui ainda um mapa de risco em dois locais visíveis aos profissionais, indicando os riscos físicos, químicos, ergonômicos, biológicos e de acidente existentes em cada ambiente.

Descarte das amostras biológicas

O descarte deve ser sempre realizado respeitando-se os critérios estabelecidos pela portaria vigente (Nº 3.204:2010/MS), em recipientes adequados e identificados. No NUPIT-SG, todo o material de descarte potencialmente contaminado (inclui-se os EPIs) é coletado por uma empresa terceirizada especializada para a posterior incineração.

Registros de vacinação da equipe

Logo após a vacina contra a COVID-19 ser disponibilizada para os profissionais de saúde envolvidos no diagnóstico da doença, todos os envolvidos foram devidamente vacinados, e as cópias dos registros de vacinação foram arquivados em pastas individuais na instituição.

REFERÊNCIAS

ABNT NBR ISO 15189:2015. Laboratórios Clínicos – Requisitos de Qualidade e Competência. Disponível em: <http://www.abnt.org.br/noticias/4225-laboratorios-clinicos-requisitos-de-qualidade-e-competencia>. Acesso em 25 de Janeiro de 2021.

PORTARIA Nº 3.204, DE 20 DE OUTUBRO DE 2010. Norma Técnica de Biossegurança para Laboratórios de Saúde Pública. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3204_20_10_2010.html. Acesso em 25 de Janeiro de 2021.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC | Nº 302, DE 13 DE OUTUBRO DE 2005. Regulamento Técnico para funcionamento

de Laboratórios Clínicos. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0302_13_10_2005.html. Acesso em 25 de Janeiro de 2021.

Título Guia de Boas Práticas e Procedimentos Operacionais Padrão para o diagnóstico da COVID-19
Formato E-book (PDF)
Tipografia Open Sans (texto) Open Sans (títulos)
Desenvolvimento Editora UFPE



Rua Acadêmico Hélio Ramos, 20 | Várzea, Recife-PE
CEP: 50740-530 | Fone: (81) 2126.8397
E-mail: editora@ufpe.br | Site: www.editora.ufpe.br



PROGRAD
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO