

MANUAL PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES NO ESTADO DE GOIÁS





Secretaria de
Estado da
Saúde



MANUAL PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES NO ESTADO DE GOIÁS

63.2100-07

Revisão 00

COORDENAÇÃO DE BIOLOGIA MÉDICA

ELABORAÇÃO: SEÇÃO DE VIROLOGIA E SEÇÃO DE
BIOLOGIA MOLECULAR

Goiânia

2022



Secretaria de
Estado da
Saúde



GOVERNADOR DO ESTADO DE GOIÁS

Ronaldo Ramos Caiado

SECRETÁRIO DE ESTADO DA SAÚDE

Sandro Rogério Rodrigues Batista

SUPERINTENDENTE DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

Flúvia Pereira Amorim da Silva

LABORATÓRIO ESTADUAL DE SAÚDE PÚBLICA DR. GIOVANNI CYSNEIROS

DIRETORIA GERAL

Vinicius Lemes da Silva

DIRETORIA ADMINISTRATIVA

Rafael Souza Guedes

DIRETORIA TÉCNICA

Luiz Augusto Pereira

COORDENAÇÃO DE BIOLOGIA MÉDICA

Robmary Matias de Almeida



Secretaria de
Estado da
Saúde



Elaborado por:

COORDENAÇÃO DA SEÇÃO DE VIROLOGIA

Yulla Fernandes dos Passos Chaves

COORDENAÇÃO DA SEÇÃO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Ana Flávia Mendonça

Revisado por:

BANCADA DE SOROLOGIA DAS ARBOVIROSES/SEÇÃO DE VIROLOGIA

Márcia Tomaz Freire

BANCADA DE SOROLOGIA DAS ARBOVIROSES/SEÇÃO DE VIROLOGIA

Janaína Queiroz da Silva

BANCADA DE ISOLAMENTO VIRAL/SEÇÃO DE VIROLOGIA

Lucileis de Fátima Fernandes da Silva

COORDENAÇÃO NÚCLEO DE VIGILÂNCIA LABORATORIAL

Andrea Finotti

Aprovado por:

COORDENAÇÃO DA BIOLOGIA MÉDICA

Robmary Matias de Almeida

DIRETORIA TÉCNICA

Luiz Augusto Pereira

DIRETORIA GERAL

Vinícius Lemes da Silva



Secretaria de
Estado da
Saúde



MISSÃO

Participar das ações de vigilância em saúde, realizando análises laboratoriais com qualidade, coordenando a rede estadual de laboratórios e gerando informações para a melhoria da saúde pública

VISÃO

Excelência da qualidade na descoberta e controle dos agravos em saúde pública visando à satisfação na comunidade.

VALORES

Compromisso com o trabalho seguro: trabalhar com segurança e responsabilidade objetivando a prevenção de acidentes e doenças decorrentes do trabalho.

Satisfação dos clientes: busca atender as expectativas dos clientes internos e externos.

Aprimoramento contínuo: colaboradores e unidade buscando a excelência profissional.

Compromisso com o SUS: respeitar e cooperar para o pleno funcionamento do sistema, considerando seus princípios: universalidade, integralidade, equidade, descentralização, regionalização, hierarquização e da participação popular.

Responsabilidade social: cumprir os deveres e obrigações dos indivíduos e empresa para com a sociedade em geral.

Ética: Conhecer os limites. Conhecer onde termina o seu direito e inicia o do outro. Conjunto de valores que devem orientar a vida do profissional e a do cidadão.





Sumário

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 1. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES NO LACEN-GO..... | 8 |
| SESSÃO A | 9 |
| DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES | 9 |
| DENGUE | 10 |
| 2.1. Pesquisa de anticorpos IgM para dengue | 10 |
| 2.2. Pesquisa do Antígeno NS1 (NS1Ag) para dengue | 13 |
| 2.3. Teste de Isolamento Viral para dengue | 14 |
| 2.4. RT-qPCR para dengue | 16 |
| 2.5. Monitoramento Epidemiológico das arboviroses | 20 |
| 2.6. Cotas mensais de envio de amostras para o diagnóstico virológico | 21 |
| 3. ZIKA | 22 |
| 3.1. Pesquisa de anticorpos IgM para Zika | 22 |
| 3.2. RT-qPCR para Zika | 23 |
| 4. FEBRE AMARELA | 28 |
| 4.1. Pesquisa de anticorpos IgM para Febre Amarela | 28 |
| 4.2. Teste de Isolamento viral para Febre Amarela | 29 |
| 4.3. RT-qPCR para Febre Amarela | 31 |
| 5. CHIKUNGUNYA | 33 |
| 5.1. Pesquisa de anticorpos IgM para Chikungunya | 33 |
| 5.2. Teste de Isolamento viral para Febre Chikungunya | 35 |
| 5.3. RT-qPCR para Chikungunya | 37 |
| 6. MAYARO | 39 |
| 6.1. Pesquisa de anticorpos IgM para Mayaro | 39 |
| 6.2. Teste de Isolamento viral para Mayaro | 40 |
| 6.3. RT-qPCR para Mayaro | 42 |
| SESSÃO B..... | 45 |
| DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM CASO DE ÓBITO SUSPEITO DE INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS | 45 |
| 7. Instruções para a coleta de amostras em situação de óbito | 46 |
| SESSÃO C..... | 49 |
| BOTIJÃO DE NITROGÊNIO | 49 |
| 8. Manuseio do botijão de nitrogênio | 50 |
| SESSÃO D | 54 |



| | |
|---|----|
| FLUXO DE RESULTADOS | 54 |
| 9. FLUXO DE RESULTADOS | 55 |
| REFERÊNCIAS | 55 |
| ANEXOS | 57 |
| ANEXO A: FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DIAGNÓSTICO DE DENGUE – SOROLOGIA IgM | 58 |
| ANEXO B: FLUXO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE ARBOVIROSES-LACEN-GO (testes realizados no período de viremia: Isolamento Viral, NS1Ag e RT-PCR)..... | 59 |
| ANEXO C: FLUXO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE ARBOVIROSES-LACEN-GO (testes sorológicos: NS1Ag, IgM e IgG) | 60 |
| ANEXO D: FLUXO DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL EM CASO DE ÓBITO SUSPEITO DE INFEÇÃO POR ARBOVÍRUS - LACEN-GO | 61 |

INTRODUÇÃO

1. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES NO LACEN-GO

O Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN-GO) realiza exames para o diagnóstico laboratorial das arboviroses: dengue, zika, febre amarela, chikungunya e mayaro, através da detecção dos vírus e/ou de seus componentes (ex. genoma viral e antígenos) e ainda, através da pesquisa de anticorpos específicos para os referidos agravos. As metodologias utilizadas são:

- Enzimaimunoensaio (ELISA);
- Isolamento viral;
- RT-PCR

Para cada agravo investigado, diferentes métodos são utilizados, dentre estes métodos estão as técnicas de detecção de IgM (Dengue, Febre Amarela, Zika, Chikungunya e Mayaro), detecção de anticorpos IgG (Chikungunya e Zika), detecção de antígeno NS1 (Dengue), Isolamento Viral (Dengue, Febre Amarela, Chikungunya e Mayaro) e detecção de genoma viral por RT-PCR em tempo real (Dengue, Febre Amarela, Zika, Chikungunya e Mayaro).

O Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) é o sistema informatizado utilizado em todos os procedimentos relacionados ao diagnóstico laboratorial, desde o cadastro, que deve ser realizado pela unidade solicitante, até os resultados que são disponibilizados pelo LACEN-GO. O sistema GAL está implantado em todos os municípios do Estado e em todas as Regionais de Saúde que dão suporte técnico aos municípios, garantindo assim, que os solicitantes tenham acesso aos resultados laboratoriais de forma oportuna.

Em caso de óbito, o teste anatomopatológico (imunohistoquímica e histopatológico) é realizado no Laboratório de Referência Nacional de Arbovírus e os resultados são disponibilizados no sistema GAL e acompanhados pelo Núcleo de Vigilância Laboratorial do LACEN-GO.



Secretaria de
Estado da
Saúde



SESSÃO A
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS
ARBOVIROSES

DENGUE

O diagnóstico laboratorial da dengue pode ser realizado por meio de métodos sorológicos (pesquisa de IgM e pesquisa de NS1), por métodos virológicos (isolamento viral e RT-PCR) e por exames anatomopatológicos (imunohistoquímica e histopatológico).

2.1. Pesquisa de anticorpos IgM para dengue

A pesquisa de anticorpos IgM deverá ser realizada em amostras de pacientes **de 5 até 60 dias após o início dos sintomas.**

2.1.1. Quando realizar a sorologia IgM para dengue?

Durante o período epidêmico da dengue, deve-se realizar a pesquisa de anticorpos IgM nas seguintes situações:

- a) **Casos suspeitos de dengue** – recomenda-se coleta de forma amostral (um a cada 10 casos).
- b) **Casos suspeitos de dengue com sinais de alarme** – coleta de amostra obrigatória em 100% dos casos.
- c) **Casos suspeitos de dengue grave e óbitos por dengue** – coleta de amostra obrigatória em 100% dos casos.

Em períodos não epidêmicos a coleta deve seguir os seguintes critérios:

- a) **Casos suspeitos de dengue** – recomenda-se coleta de amostra de 100% dos casos.
- b) **Casos suspeitos de dengue com sinais de alarme** – coleta de amostra obrigatória em 100% dos casos.
- c) **Casos suspeitos de dengue grave e óbitos por dengue** – coleta de amostra obrigatória em 100% dos casos.

Para a detecção de anticorpos IgM, não existe uma cota pré-definida, porém em caso de um aumento excessivo de amostras recebidas no LACEN-GO, as regionais de saúde e os municípios serão informados e poderá ser estipulado uma cota levando-se em consideração o máximo de 10% do número de casos notificados para o referido agravo no período epidêmico.

2.1.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para pesquisa de IgM para dengue

Colher assepticamente 10 ml de sangue preferencialmente **entre o 5º e o 60º dia após o início dos sintomas**, utilizar seringa ou tubo a vácuo, sem anticoagulante, previamente identificado. Esperar a retração do coágulo por 30 minutos em temperatura ambiente. Centrifugar a 4.000 rpm por 10 minutos e separar 2 a 4 ml de soro. Transferir o soro assepticamente para tubo plástico, estéril, com tampa de rosca, devidamente identificado e conservar em freezer a -20°C. Alternativamente essa amostra poderá ficar armazenada sob refrigeração entre 2 a 8°C por no máximo 7 dias, sendo que após este período a amostra deve ser obrigatoriamente armazenada a -20°C. Transportá-la em caixa térmica com gelo reciclável. Não se recomenda a utilização de amostras de soro que apresentam contaminação microbiana, hemólise ou lipemia.

O rótulo deve conter de forma legível o nome do exame, nome completo do paciente por extenso, data da coleta, tipo de amostra e número da amostra (se 1ª ou 2ª amostra), usar etiquetas com tinta resistente aos meios de conservação.

Para assegurar a qualidade das amostras e garantir um diagnóstico em tempo hábil é necessário enviar as amostras ao LACEN-GO em no máximo 15 dias após a coleta (não estocar amostras).

ATENÇÃO: As amostras deverão estar acompanhadas de ficha epidemiológica devidamente preenchida e legível, sendo imprescindível o nome completo do paciente, data de nascimento, tipo de material, data da coleta, data do início de sintoma e ficha de cadastro no GAL.

Quadro 1. Amostras para Pesquisa de anticorpos IgM para dengue

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|---------------------|--|--|---|--|
| Dengue IgM | Soro ou líquido A partir do 5º até 60º dia de sintomas (preferência entre o 7º e 45º dia) | -20°C (Congelar) Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) por no máximo 7 dias, após esse período a amostra deve ser congelada | Ideal: Enviar em até 7 dias Gelo reciclável em caixa térmica | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para a pesquisa de anticorpos IgM. |

2.1.3. Avaliação da Qualidade do Diagnóstico de Dengue (AQDD) – Sorologia IgM

Com a descentralização do diagnóstico sorológico para Pesquisa de anticorpos IgM para dengue, tornou-se necessário avaliar a qualidade do diagnóstico realizado pelos laboratórios municipais que compõem a rede laboratorial (REDELAB) e recebem insumos do Ministério da Saúde para este fim.

O quantitativo de amostras que deverão ser enviadas ao LACEN-GO para “Avaliação da Qualidade do Diagnóstico de Dengue (AQDD)” deverá ser:

- a) **Período Epidêmico:** enviar 3% das amostras testadas (2% das amostras negativas e 1% das amostras positivas).
- b) **Período Interepidêmico:** enviar 10% das amostras testadas (7% das amostras negativas e 3% das amostras positivas).

As amostras destinadas a “AQDD” deverão ser armazenadas a -20°C (freezer), transportadas com gelo reciclável em caixa térmica e enviadas juntamente com o formulário próprio, completamente e corretamente preenchido (ANEXO A), **pelo menos a cada dois meses**. Enviar uma alíquota ao LACEN-GO e estocar outra alíquota para contraprova no laboratório de origem, quando esta se fizer necessária.

As amostras serão retestadas com o mesmo kit utilizado no laboratório solicitante. Será avaliada a concordância entre os resultados obtidos no laboratório solicitante e os resultados do LACEN-GO. O relatório da avaliação final e o certificado de concordância serão repassados via SEI a regional de saúde da abrangência do município e por e-mail ao laboratório do município solicitante.

Quando comparamos os resultados com o mesmo kit utilizado no município, pretendemos avaliar os procedimentos técnicos empregados na reação sorológica.

A partir destas avaliações será possível estabelecer critérios para atualizações técnicas e capacitações dos profissionais que realizam testes laboratoriais, além de subsidiar o Ministério da Saúde com dados sobre a qualidade dos kits utilizados.

2.2. Pesquisa do Antígeno NS1 (NS1Ag) para dengue

2.2.1. Quando realizar a sorologia para detecção do antígeno NS1?

A pesquisa do NS1Ag deverá ser realizada em amostras de pacientes **com até 5 dias de sintomas**, de preferência coletar amostra no 3º dia do início dos sintomas.

2.2.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para o diagnóstico sorológico – NS1Ag

Coletar assepticamente 10 ml de sangue com seringa ou tubo a vácuo sem anticoagulantes, previamente identificado, em pacientes **com até 5 dias** do início dos sintomas, preferencialmente até o 3º dia. Esperar a retração do coágulo por 30 minutos. Centrifugar a 4.000 rpm por 10 minutos e separar 2 a 4 ml de soro. Transferir o soro assepticamente para tubo plástico, estéril, com tampa de rosca, devidamente identificado e conservar em freezer a -20°C. Alternativamente essa amostra poderá ficar armazenada sob refrigeração entre 2 a 8°C por no máximo 7 dias, sendo que após este período a amostra deve ser obrigatoriamente armazenada a -20°C. Transportá-la em caixa térmica com gelo reciclável. Não se recomenda a utilização de amostras de soro que apresentam contaminação microbiana, hemólise ou lipemia.

O rótulo deve conter de forma legível o nome do exame, nome completo do paciente por extenso, data da coleta, tipo de amostra e número da amostra (se 1ª ou 2ª amostra), usar etiquetas com tinta resistente aos meios de conservação.

Para assegurar a qualidade das amostras e garantir um diagnóstico em tempo hábil é necessário enviar as amostras ao LACEN-GO em no máximo 15 dias após a coleta (não estocar amostras).

ATENÇÃO: As amostras deverão estar acompanhadas de ficha epidemiológica devidamente preenchida e legível, sendo imprescindível o nome completo do paciente, data de nascimento, tipo de material, data da coleta, data do início de sintoma e ficha de cadastro no GAL.

Quadro 2. Amostras para Pesquisa de NS1Ag para dengue

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|---------------------|--|---|--|---|
| NS1Ag Dengue | Soro Até 5º dia de sintomas (preferencialmente 3º dia) | -20°C (Congelar) Alternativa: 2 a 8°C (refrigerar) por no máximo 7 dias , após esse período a amostra deve ser congelada | Ideal: Enviar em até 7 dias Gelo reciclável em caixa térmica | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para a pesquisa de NS1Ag. |

Para a detecção de antígeno NS1, não existe uma cota pré-definida, porém em caso de um aumento excessivo de amostras recebidas no LACEN-GO, as regionais de saúde e os municípios serão informados e poderá ser estipulado uma cota levando-se em consideração o máximo de 10% do número de casos notificados para o referido agravo no período epidêmico.

2.3. Teste de Isolamento Viral para dengue

Além do monitoramento dos DENV (1, 2, 3 e 4) circulantes em cada região de saúde de Goiás, este ensaio tem por objetivo detectar a introdução ou recirculação de um novo sorotipo viral. Essas informações são importantes para Vigilância Epidemiológica da dengue, alertando este sistema quanto às mudanças no perfil epidemiológico dos DENV no Estado.

Para as coletas de isolamento viral o município deverá solicitar previamente as Regionais de Saúde os criotubos para acondicionamento das amostras e seguir as cotas mensais estabelecidas para o diagnóstico virológico, descritas a seguir no Item 2.6 - Tabela 1 – Cota mensal de coleta de amostra para o diagnóstico virológico, por Regional de Saúde em Goiás.

2.3.1. Quando realizar o isolamento viral para dengue?

A amostra de sangue total (**sem anticoagulante**) deverá ser coletada **até o 5º dia do início dos sintomas** durante a fase de viremia da doença, que se inicia no período febril, dando-se preferência para coletas até o 3º dia de sintomas.

2.3.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para o isolamento viral de dengue

a) Isolamento viral para dengue em amostras de sangue total:

Coletar assepticamente 2 ml de sangue total (**sem anticoagulante**), em pacientes **com até 5 dias** do início dos sintomas, preferencialmente até o 3º dia. As amostras deverão ser acondicionadas individualmente em tubos criogênicos (criotubos) com tampa de rosca, **fornecidos pelo LACEN-GO**, e devem ser devidamente identificados e armazenados imediatamente em botijão com nitrogênio líquido. Alternativamente essas amostras podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C), por no máximo 48h até serem transferidas para o botijão de nitrogênio ou encaminhadas para o LACEN-GO. **Nunca deixar estas amostras em temperatura ambiente.**

b) Isolamento viral para dengue em amostras de vísceras:

Devem ser coletados 02 fragmentos de aproximadamente 1cm³ de cada uma das seguintes vísceras: fígado, rins, baço, cérebro, pulmão, pâncreas e coração, em até no máximo 24h após o óbito, e acondicionadas individualmente em tubos criogênicos (criotubos), com tampa de rosca, fornecidos pelo LACEN-GO. Os tubos devem ser devidamente identificados e armazenados em um mesmo saco plástico (um saco plástico para cada paciente). Armazenar as amostras imediatamente em botijão com nitrogênio líquido.

Quadro 3. Amostras para Isolamento viral de dengue

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|---------------------|---|---|---|---|
| Isolamento viral | Sangue total Até 5º dia de sintomas (preferencialmente 3º dia) | Botijão com nitrogênio líquido Alternativa: 2 a 8°C (refrigerar) por no máximo 48h, após esse período a amostra deve ser acondicionada no botijão com N2 | Preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para o diagnóstico de Dengue por isolamento viral |
| Isolamento viral | Vísceras (1cm ³ de amostras <i>in-natura</i> acondicionadas em criotubos) | Botijão com nitrogênio líquido | Em botijão com nitrogênio líquido | |

As amostras para isolamento viral poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48h, podendo ser encaminhadas ao LACEN-GO em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior às 48h as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

2.4. RT-qPCR para dengue

O teste de detecção e tipagem do vírus dengue por RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR) é realizado pela Seção de Biologia Molecular do LACEN-GO, utilizando-se a amplificação do RNA do vírus por RT-qPCR “in house”, com a utilização de conjuntos de “primers” específicos para os quatro sorotipos do vírus dengue, segundo protocolo referenciado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) em 2013 e repassado pelo Laboratório de Referência Nacional para Arbovírus IEC-PA, aos LACENs.

O diagnóstico molecular da dengue é fundamental para a identificação dos sorotipos virais circulantes e detecção precoce do surgimento de um novo sorotipo, contribuindo de maneira importante para o sistema de vigilância epidemiológica da

doença. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é útil durante o período de viremia da doença.

O teste de Detecção Qualitativa do RNA do vírus Dengue é direcionado para identificação diagnóstica de sorotipo viral em casos graves de Dengue com complicações, principalmente neurológica ou quadros de infecção crônica com suspeita de viremia, além de casos de diagnóstico diferencial *post mortem*. Desta forma os principais espécimes clínicos utilizados para pesquisa do vírus Dengue por RT-PCR são SORO, LCR (Líquido Cefalorraquidiano) e Fragmentos de Tecidos coletados de pacientes suspeitos pelos SVO (Serviço de Verificação de Óbitos).

Para realização do exame a amostra deverá estar acompanhada de pedido médico da unidade solicitante descrevendo o quadro e cópia da ficha epidemiológica de registro no SINAN.

A realização de um exame de biologia molecular de qualidade depende essencialmente de coleta, armazenamento e transporte realizados de maneira adequada das amostras a serem analisadas.

2.4.1. Quando realizar *RT-qPCR* para dengue?

A viremia inicia-se durante o período febril e a amostra adequada para realização de RT-qPCR deve ser coletada **até 5 dias de início dos sintomas**. Amostras coletadas a partir do sétimo dia até o décimo apresentam baixíssima chance de serem detectadas por esta metodologia.

2.4.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras biológicas para realização do teste de *RT-qPCR* para dengue

A Detecção e Tipagem do vírus Dengue por RT-qPCR têm grande relevância na elucidação de quadros graves da doença em dois espécimes clínicos:

- a) **Soro (pelo menos 1 mL)** - Coletar assepticamente 2 a 5 ml de sangue com seringa ou tubo a vácuo sem anticoagulantes entre **1º e 5º dia** após o início dos sintomas. Separar o soro após a retração do coágulo em tempo mínimo possível (centrifugar a 1.500 rpm, durante 10 minutos). Armazenar de 2 a 8°C

no máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO

- b) **LCR (Líquido Cefalorraquidiano) / Líquor (pelo menos 1 mL)** - Após coleta, o material deve ser colocado em criotubo estéril e devidamente rotulado com os dados do paciente. Armazenar de 2 a 8°C – máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.

As amostras deverão ser acondicionadas em tubos plásticos descartáveis estéreis com tampa de rosca, devidamente rotulados e lacrados. Vale ressaltar que estes tubos devem suportar congelamento as baixas temperaturas (tubos criogênicos). Após a coleta e congelamento para envio ao LACEN-GO em hipótese alguma o material deverá ser descongelado, o que inviabiliza a realização do exame.

2.4.3. Orientação para rotulagem e envio das amostras para realização do teste de RT-qPCR para dengue

Colocar a amostra em saco plástico individualizado (separar por paciente), dentro de uma canaleta identificada no botijão de nitrogênio líquido, **imediatamente após a coleta e preparação**. Sugere-se tampar a canaleta do botijão com um chumaço de algodão para que o tubo não se perca dentro deste.

Para realização do exame a amostra deverá estar acompanhada de ficha epidemiológica devidamente preenchida e legível ou cópia da mesma, pedido médico específico para teste de biologia molecular (RT-qPCR para Dengue) com descritivo da suspeita médica e a fichas de cadastro no GAL.

O rótulo deve conter nome do exame, nome completo do paciente por extenso, data e hora da coleta e natureza da amostra, usar etiquetas com tinta resistente aos meios de conservação e escrita de forma legível.

2.4.4. Acondicionamento e Transporte

As amostras deverão ser acondicionadas em tubos plásticos resistente a baixas temperaturas (criotubos), com tampa de rosca, devidamente rotulados e lacrados.

Excepcionalmente, essas amostras poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48 horas, podendo ser encaminhadas ao LACEN em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo e garanta-se a manutenção da amostra na referida temperatura. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior às 48 horas as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

O transporte das amostras deverá ser realizado preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido ou gelo reciclável em caixas térmicas para amostras que ficaram refrigeradas entre 2 a 8°C por até 48 horas.

Quadro 4. Orientações de Coleta e Envio de Amostras para diagnóstico molecular de Dengue por RT-qPCR

| Tipo de diagnóstico | Tipo de espécime biológico | Recipiente/ Volume | Período para coleta | Armazenamento/ Conservação | Transporte |
|---------------------|---|---|---|--|---|
| RT-qPCR | Soro Obtenção de amostras: punção venosa (casos graves) ou punção intracardíaca (óbito) | Criotubo: 1 mL de amostra | 1º ao 5º dia de sintomas | Botijão de Nitrogênio Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Botijão de Nitrogênio Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. |
| | Líquor Punção lombar ou coleta a partir da necropsia (óbito) | Criotubo: 1 mL de amostra | Complicações neurológicas até 15 dias do início dos sintomas (casos graves) Logo após o óbito (ideal em até 8 horas) | Botijão de Nitrogênio Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Botijão de Nitrogênio Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. |
| | Fragmentos de Tecidos Coleta a partir da necropsia (óbito) Fígado, baço, Cérebro, pulmão, rins, coração e linfonodos | Criotubo: Fragmento de 1cm ³ | Logo após o óbito (ideal em até 8 horas) | Botijão de Nitrogênio ou Freezer -70° C | Botijão de Nitrogênio ou Gelo Seco |
| | Derrames Cavitários | Criotubo: 2 mL de | Logo após o óbito (ideal em até 8 horas) | Botijão de Nitrogênio ou Freezer -70° C | Botijão de Nitrogênio ou Gelo Seco |

| | | | | | |
|--|---|---------|--------|--|--|
| | Coleta a partir da necropsia (óbito) Líquido Ascítico, Derrame Pleural e Derrame Pericárdico | amostra | horas) | | |
|--|---|---------|--------|--|--|

Fonte: Guia para Diagnóstico Laboratorial em Saúde Pública MS/SVS/DAEVS- 2021

2.5. Monitoramento Epidemiológico das arboviroses

Com a ocorrência da múltipla circulação de Dengue, Chikungunya e Zika, intituladas arboviroses urbanas pelo Ministério da Saúde, o cenário traz uma grande diversidade de desafios para a Saúde Pública. Para este cenário, fez-se necessário o monitoramento detalhado dos arbovírus circulantes de modo permanente, com o objetivo de detectar oportunamente a circulação viral de dengue (sorotipos), chikungunya e Zika. Essa atividade é de fundamental importância, uma vez que a alternância dos sorotipos de dengue e a introdução/reintrodução/predominância desses arbovírus estão relacionadas à ocorrência de epidemias.

O tempo recomendado para coleta de amostras para diagnóstico direto das arboviroses (Isolamento Viral, RT-qPCR e pesquisa de NS1) é até o 5º (quinto) dia da data de início dos sintomas. Para isso, o paciente deve ter a sua amostra coletada no primeiro acesso ao sistema de saúde, desde que atenda às definições de caso suspeito. Ou seja, se o paciente procura a unidade de saúde dentro dos cinco primeiros dias de sintomas, deve ter amostras priorizadas para os testes virológicos e/ou de biologia molecular.

Frente ao exposto, exclusivamente para o Monitoramento Epidemiológico das arboviroses, mediante as cotas estabelecidas para o diagnóstico virológico das arboviroses (ver tabela 1, item 2.6) para as Regionais de Saúde, orientamos o envio de duas amostras de Soro e uma de Sangue total (sem anticoagulante) em criotubos (fornecidos pelo LACEN) devidamente identificados, onde o cadastro para amostras de "SORO" deverá ser a Pesquisa de "PCR-Arbovírus" e Dengue, NS1Ag, e para amostra de "SANGUE TOTAL" deverá ser "Dengue, Isolamento Viral".

Excepcionalmente, essas amostras poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48 horas, podendo ser encaminhadas ao LACEN em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo e garanta-se a manutenção da amostra na referida temperatura. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior às 48 horas as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

O transporte das amostras deverá ser realizado preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido ou gelo reciclável em caixas térmicas para amostras que ficaram refrigeradas entre 2 a 8°C por até 48 horas.

2.6. Cotas mensais de envio de amostras para o diagnóstico virológico

No intuito de realizar a vigilância virológica em Goiás (Isolamento Viral e PCR-Arbovírus), foram estabelecidas cotas mensais de coleta de amostras, para cada Regional de Saúde conforme tabela a seguir:

Tabela 1 – Cota mensal de coleta de amostra para o diagnóstico virológico, por Regional de Saúde em Goiás.

| REGIONAL DE SAÚDE | NÚMERO DE AMOSTRAS/COTA MÊS |
|-----------------------|-----------------------------|
| ARS São Patrício I | 20 |
| ARS São Patrício II | 20 |
| ARS Norte | 20 |
| ARS Serra da Mesa | 20 |
| ARS Pirineus | 30 |
| ARS Central | 100 |
| ARS Centro/Centro Sul | 50 |
| ARS Rio Vermelho | 20 |
| ARS Oeste I | 20 |
| ARS Oeste II | 20 |
| ARS Entorno Norte | 20 |
| ARS Nordeste I | 15 |
| ARS Nordeste II | 15 |
| ARS Entorno Sul | 50 |
| ARS Sudoeste I | 20 |
| ARS Sudoeste II | 20 |
| ARS Estrada de Ferro | 30 |
| ARS Sul | 30 |
| Total | 520 amostras/mês |

Desta forma, distribuiu-se a capacidade instalada do LACEN-GO em cotas a serem utilizadas pelas Regionais de Saúde, tornando-se imprescindível uma boa seleção dos pacientes elegíveis para a realização deste exame e ficando a critério de cada Regional a distribuição destas cotas entre os municípios.

Observação: os tubos para o acondicionamento das amostras (criotubos) para o diagnóstico virológico serão disponibilizados pelo LACEN-GO às Regionais de Saúde conforme cota mensal estabelecida. Ficará sob a responsabilidade da Regional de Saúde realizar a distribuição dos criotubos aos municípios pertencentes à sua região, assim como o gerenciamento dos botijões de nitrogênio entre os municípios.

3. ZIKA

O diagnóstico laboratorial da zika pode ser realizado por meio de métodos sorológicos (pesquisa de IgM e pesquisa de IgG) e por métodos virológicos (RT-PCR).

3.1. Pesquisa de anticorpos IgM para Zika

3.1.1. Quando realizar a sorologia para zika?

A amostra de soro ou líquido deverá ser coletada **entre o 5º e o 90º dia do início dos sintomas** da doença.

3.1.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para Pesquisa de IgM para Zika

Colher assepticamente 10 ml de sangue preferencialmente entre o **5º e 90º dia após o início dos sintomas**. Utilizar seringa ou tubo a vácuo, sem anticoagulante, previamente identificado. Esperar a retração do coágulo por 30 minutos em temperatura ambiente. Centrifugar a 4.000 rpm por 10 minutos e separar 2 a 4 ml de soro. Transferir o soro assepticamente para tubo plástico, estéril, com tampa de rosca, devidamente identificado e conservar em freezer a -20°C . Alternativamente essa amostra poderá ficar armazenada sob refrigeração entre 2 a 8°C por no máximo 7 dias, sendo que após este período a amostra deve ser obrigatoriamente armazenada a -20°C . Transportá-la em

caixa térmica com gelo reciclável. Não se recomenda a utilização de amostras de soro que apresentam contaminação microbiana, hemólise ou lipemia.

O rótulo deve conter de forma legível o nome do exame, nome completo do paciente por extenso, data da coleta, tipo de amostra e número da amostra (se 1ª ou 2ª amostra), usar etiquetas com tinta resistente aos meios de conservação.

Para assegurar a qualidade das amostras e garantir um diagnóstico em tempo hábil é necessário enviar as amostras ao LACEN-GO em no máximo 15 dias após a coleta (não estocar amostras).

ATENÇÃO: As amostras deverão estar acompanhadas de ficha epidemiológica devidamente preenchida e legível, sendo imprescindível o nome completo, data de nascimento, tipo de material, data da coleta, data do início de sintoma e ficha de cadastro no GAL.

Quadro 5. Amostras para Pesquisa de IgM para Zika

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|---------------------|--|--|--|---|
| IgM Zika | Soro ou líquido A partir do 5º dia de sintomas até 90º dia. (preferência entre o 7º e 45º dia) | -20°C (Congelar) Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) por no máximo 7 dias, após esse período a amostra deve ser congelada | Ideal: Enviar em até 7 dias Gelo reciclável em caixa de térmica | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para o diagnóstico de IgM para Zika |

3.2. RT-qPCR para Zika

O teste de detecção do RNA do vírus Zika é direcionado para confirmação diagnóstica de casos suspeito de gestante com exantema maculopapular pruriginoso, casos de manifestações neurológicas com histórico de infecção viral prévia, crianças recém-nascidas com microcefalia e óbitos suspeitos de envolvimento com ZIKV. A metodologia utilizada é RT-PCR em Tempo Real segundo LRN-IEC/CDC, 2016.

Para realização do exame a amostra deverá estar acompanhada de pedido médico da unidade de saúde e cópia da ficha de Notificação/Conclusão e fichas de cadastro no GAL.

3.2.1. Quando realizar *RT-qPCR* para Zika?

A amostra adequada para realização de RT-qPCR deve ser coletada **até 5 dias de início dos sintomas**. Amostras coletadas a partir do sétimo dia até o décimo apresentam baixíssima chance de serem detectadas por esta metodologia.

3.2.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras biológicas para realização do teste de RT-PCR para Zika

3.2.3. Tipos de Amostras:

a) Gestante com suspeita de infecção por ZIKV:

- **Soro:** Venopunção em tubo sem anticoagulante, colher **até o 5º dia** do início dos sintomas.
- **Urina:** Coletar amostra de urina em recipiente estéril e encaminhar alíquota de no mínimo 3 mL em tubo cônico tipo Falcon ou em criotubo (com pelo menos 1 mL em cada) , **até o 14º dia** do início dos sintomas.

b) Neonato com Microcefalia suspeita por ZIKV:

- **Sangue do Cordão Umbilical:** Proceder à coleta por conveniência no momento do parto e priorizar a separação do soro.
- **Urina:** Proceder a coleta por conveniência em Coletor infantil e encaminhar alíquota de no mínimo 1 mL em criotubo ou de no mínimo 3 mL em tubo cônico tipo Falcon.
- **LCR:** Punção lombar (punção espinal). Procedimento a ser realizado por critério do médico responsável.
- **Fragmento de placenta:** Proceder à coleta por conveniência no momento do parto. Coletar fragmentos de até 1cm³.

c) Nati-morto com Microcefalia/má-formação suspeita por ZIKV:

- **Fragmentos de Visceras provenientes do SVO:** Coletar fragmentos de até 1cm³.

d) Óbito suspeito por ZIKV encaminhado do SVO:

- **Fragmentos de Visceras provenientes do SVO:** Em caso de óbito, coletar fragmento de tecido dos sítios com lesão evidenciada, preferencialmente: fígado, baço, cérebro, e linfonodos. Outras amostras como sangue pós-óbito e LCR deverão ser coletadas para pesquisa pareada do vírus. Todas as amostras deverão ser acondicionadas em microtubos distintos e identificadas de acordo com o sítio coletado. Armazenar em botijão de nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.

3.2.4. Material e conservação para envio:

- a) 1 ml de Soro:** Separar o soro realizando a retração do coágulo em tempo mínimo possível. Armazenar de 2 a 8°C no máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.
- b) Urina:** Armazenar de 2 a 8°C no máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.
- c) Sangue do Cordão Umbilical:** Separar o soro realizando a retração do coágulo em tempo mínimo possível. Armazenar de 2 a 8°C no máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.
- d) 1 ml de LCR:** - Após coleta, o material deve ser colocado em criotubo estéril e devidamente rotulado com os dados do paciente. Armazenar de 2 a 8°C – máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.
- e) Fragmento de Placenta:** Coletar fragmentos de até 1cm³. Os fragmentos deverão ser acondicionados em criotubo com identificação da amostra e data

da coleta. Encaminhar imediatamente ou armazenar em botijão de nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.

- f) Fragmentos das Vísceras provenientes de Feto Morto encaminhado pelo SVO:** Em caso de óbito, colher fragmento de fígado, baço, cérebro e pulmão. Outras amostras poderão ser coletadas de acordo com critério médico. Coletar fragmentos de até 1cm³. Os fragmentos deverão ser acondicionados em criotubos distintos e identificados de acordo com o sítio coletado. Armazenar em botijão de nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.

3.2.5. Acondicionamento e Transporte

As amostras deverão ser acondicionadas em tubos plásticos resistente a baixas temperaturas (criotubos), com tampa de rosca, devidamente rotulados e lacrados.

Excepcionalmente, as amostras de soro, sangue de cordão, líquido e urina poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48 horas, podendo ser encaminhadas ao LACEN em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo e garanta a manutenção da amostra na referida temperatura. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior às 48 horas as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

O transporte das amostras deverá ser realizado preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido ou gelo reciclável em caixas térmicas para amostras que ficaram refrigeradas entre 2 a 8°C por até 48 horas.

Quadro 6. Orientações de Coleta e Envio de Amostras para diagnóstico molecular de Zika por RT-qPCR

| Tipo de diagnóstico | Tipo de espécime biológico | Recipiente/ Volume | Período para coleta | Armazenamento/ Conservação | Transporte |
|---------------------|--|---|--|---|--|
| RT-qPCR | <p>Soro</p> <p>Obtenção de amostras: punção venosa (casos graves) ou punção intracardíaca (óbito)</p> | Criotubo: 1 mL de amostra | 1º ao 5º dia de sintomas | <p>Botijão de Nitrogênio</p> <p>Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO.</p> | <p>Botijão de Nitrogênio</p> <p>Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO.</p> |
| | <p>Líquor</p> <p>Punção lombar ou coleta a partir da necropsia (óbito)</p> | Criotubo: 1 mL de amostra | <p>Complicações neurológicas até 15 dias do início dos sintomas (casos graves)</p> <p>Logo após o óbito (ideal em até 8 horas)</p> | <p>Botijão de Nitrogênio</p> <p>Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO.</p> | <p>Botijão de Nitrogênio</p> <p>Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO.</p> |
| | <p>Urina</p> | <p>Tubo tipo Falcon: 3 mL de amostra</p> <p>Criotubo: 1 mL de amostra</p> | Até o 14º dia de sintomas | <p>Botijão de Nitrogênio</p> <p>Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO.</p> | <p>Botijão de Nitrogênio</p> <p>Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO.</p> |
| | <p>Fragments de Tecidos</p> <p>Coleta a partir da necropsia (óbito)</p> <p>Fígado, baço, Cérebro, pulmão, rins, coração e linfonodos</p> <p>Gestantes: placenta e anexos fetais</p> | Criotubo: Fragmento de 1cm ³ | Logo após o óbito (ideal em até 8 horas) | <p>Botijão de Nitrogênio ou Freezer -70° C</p> | <p>Botijão de Nitrogênio ou Gelo Seco</p> |

Fonte: Guia para Diagnóstico Laboratorial em Saúde Pública MS/SVS/DAEVS- 2021

4. FEBRE AMARELA

O diagnóstico laboratorial da febre amarela pode ser realizado por meio de métodos sorológicos (pesquisa de IgM), por métodos virológicos (isolamento viral ou RT-PCR) e por exames anatomopatológicos (imunohistoquímica e histopatológico).

4.1. Pesquisa de anticorpos IgM para Febre Amarela

4.1.1. Quando realizar a sorologia para Febre Amarela?

A amostra de soro ou líquido deverá ser coletada **entre o 5º e o 90º dia do início dos sintomas** da doença.

4.1.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para a Pesquisa de IgM para Febre Amarela

Colher assepticamente 10 ml de sangue preferencialmente entre o **5º e 90º dia após o início dos sintomas**. Utilizar seringa ou tubo a vácuo, sem anticoagulante, previamente identificado. Esperar a retração do coágulo por 30 minutos em temperatura ambiente. Centrifugar a 4.000 rpm por 10 minutos e separar 2 a 4 ml de soro. Transferir o soro assepticamente para tubo plástico, estéril, com tampa de rosca, devidamente identificado e conservar em freezer a -20°C . Alternativamente essa amostra poderá ficar armazenada sob refrigeração entre 2 a 8°C por no máximo 7 dias, sendo que após este período a amostra deve ser obrigatoriamente armazenada a -20°C . Transportá-la em caixa térmica com gelo reciclável. Não se recomenda a utilização de amostras de soro que apresentam contaminação microbiana, hemólise ou lipemia.

O rótulo deve conter de forma legível o nome do exame, nome completo do paciente por extenso, data da coleta, tipo de amostra e número da amostra (se 1ª ou 2ª amostra), usar etiquetas com tinta resistente aos meios de conservação.

Para assegurar a qualidade das amostras e garantir um diagnóstico em tempo hábil é necessário enviar as amostras ao LACEN-GO em no máximo 15 dias após a coleta (não estocar amostras).

ATENÇÃO: As amostras deverão estar acompanhadas de ficha epidemiológica devidamente preenchida e legível, sendo imprescindível o nome completo, data de nascimento, tipo de material, data da coleta, data do início de sintoma e ficha de cadastro no GAL.

Quadro 7. Pesquisa de IgM para Febre Amarela

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|-------------------------|--|---|--|---|
| IgM Febre Amarela | Soro ou Líquor A partir do 5º dia até 90º dia de sintomas | -20°C (Congelar) Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) por no máximo 7 dias, após esse período a amostra deve ser congelada | Ideal: Enviar imediatamente Gelo reciclável em caixa de térmica | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para o diagnóstico de IgM para Febre Amarela. |

4.2. Teste de Isolamento viral para Febre Amarela

O isolamento viral para Febre Amarela é realizado concomitantemente ao teste para Isolamento Viral da Dengue e segue o mesmo processo de cultivo celular e identificação por imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais.

4.2.1. Quando realizar o isolamento viral para febre amarela?

A amostra de sangue total (**sem anticoagulante**) deverá ser coletada **até o 5º dia do início dos sintomas** durante a fase de viremia da doença, que se inicia no período febril, dando-se preferência para coletas até o 3º dia de sintomas.

4.2.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para o isolamento viral de febre amarela

a) Isolamento viral em amostras de sangue total:

Coletar assepticamente 2 ml de sangue total (**sem anticoagulante**), em pacientes **com até 5 dias** do início dos sintomas, preferencialmente até o 3º dia. As amostras deverão ser acondicionadas individualmente em tubos criogênicos (criotubos) com tampa de rosca, **fornecidos pelo LACEN-GO**, e devem ser devidamente

identificados e armazenados imediatamente em botijão com nitrogênio líquido. Alternativamente essas amostras podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C), por no máximo 48h até serem transferidas para o botijão de nitrogênio ou encaminhadas para o LACEN-GO. **Nunca deixar estas amostras em temperatura ambiente.**

b) Isolamento viral em amostras de vísceras:

Devem ser coletados 02 fragmentos de aproximadamente 1cm³ de cada uma das seguintes vísceras: fígado, rins, baço, cérebro, pulmão, pâncreas e coração, em até no máximo 24h após o óbito, e acondicionadas individualmente em tubos criogênicos (criotubos), com tampa de rosca, fornecidos pelo LACEN-GO. Os tubos devem ser devidamente identificados e armazenados em um mesmo saco plástico (um saco plástico para cada paciente). Armazenar as amostras imediatamente em botijão com nitrogênio líquido.

Quadro 8. Amostras para Isolamento viral de Febre Amarela

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|---------------------|--|---|---|---|
| Isolamento viral | Sangue total Até 5º dia de sintomas (preferencialmente 3º dia) | Botijão com nitrogênio líquido Alternativa: 2 a 8°C (refrigerar) por no máximo 48h, após esse período a amostra deve ser acondicionada no botijão com N2 | Preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para o diagnóstico de Dengue por isolamento viral |
| Isolamento viral | Vísceras (1cm ³ de amostras in-natura acondicionadas em criotubos) | Botijão com nitrogênio líquido | Em botijão com nitrogênio líquido | |

As amostras para isolamento viral poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48h, podendo ser encaminhadas ao LACEN-GO em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior a 48h as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

4.3. RT-qPCR para Febre Amarela

O diagnóstico molecular do vírus da Febre Amarela é realizado através da técnica RT-PCR em tempo real e é recomendado para **fase inicial dos sintomas (1 a 10 dias)** em amostras de soro. O RNA do vírus amarelo pode ser identificado no soro, urina ou fragmento de tecidos (especialmente fígado) encaminhados pelo SVO.

No atual cenário de circulação de vários arbovírus, há relevância na avaliação laboratorial de todos os casos suspeitos e de diagnóstico diferencial para casos de óbitos encaminhados pelo SVO. A metodologia utilizada é RT-PCR em Tempo Real segundo LRN-IEC, 2016.

Para realização do exame a amostra deverá estar acompanhada de cópia da ficha de investigação de Febre Amarela e ficha de cadastro no GAL.

4.3.1. Quando realizar RT-qPCR para Febre Amarela?

A amostra adequada para realização de RT-qPCR deve ser coletada **de 1 a 10 dias de início dos sintomas.**

4.3.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras biológicas para realização do teste de RT-qPCR para Febre Amarela

4.3.3. Tipos de Amostras e Conservação:

a) **Soro:** Venopunção em tubo sem anticoagulante, colher do **01 até 10 dias do início dos primeiros sintomas** e eventualmente em eventos adversos pós-vacinais. Armazenar de 2 a 8°C – máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.

b) **Urina:** Proceder a coleta até o 15º dia do início dos sintomas e encaminhar alíquota de no mínimo 1 mL em criotubo ou de no mínimo 3 mL em tubo cônico

tipo Falcon. Armazenar de 2 a 8°C – máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.

c) Fragmentos de Vísceras provenientes do SVO: Em caso de óbito, coletar fragmento de fígado, baço, cérebro e pulmão (Coletar fragmentos de até 1cm³). Os fragmentos deverão ser acondicionados em criotubos distintos e identificados de acordo com o sítio coletado. Armazenar em botijão de nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.

OBS: Outras amostras, como LCR ou sangue *post mortem*, poderão ser coletadas de acordo com critério médico.

4.3.4. Acondicionamento e Transporte:

As amostras deverão ser acondicionadas em tubos plásticos resistente a baixas temperaturas (criotubos), novos com tampa de rosca, devidamente rotulados e lacrados. Os tubos devem suportar congelamento a baixas temperaturas.

Excepcionalmente, as amostras de soro e urina poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48 horas, podendo ser encaminhadas ao LACEN em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo e garanta-se a manutenção da amostra na referida temperatura. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior às 48 horas as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

O transporte das amostras deverá ser realizado preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido ou gelo reciclável em caixas térmicas para amostras que ficaram refrigeradas entre 2 a 8°C por até 48 horas.

Quadro 9. Orientações de coleta, conservação e transporte das amostras para diagnóstico molecular por RT-qPCR de Febre Amarela.

| Tipo de diagnóstico | Tipo de material | Volume | Período da Coleta | Armazenamento/ conservação | Transporte |
|---------------------|---|---------------------------|---|--|--|
| RT-qPCR | Soro Punção venosa (casos graves) ou punção intracardíaca (óbito) | Criotubo: 1 mL de amostra | Coletar o sangue sem anticoagulante entre 1 e 10 dias após o início dos sintomas e eventualmente em | Botijão de Nitrogênio Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Botijão de Nitrogênio Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica |

| | | | | | |
|--|---|--|---|--|--|
| | | | eventos adversos pós vacinais | | para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. |
| | Urina | Tubo tipo Falcon: 3 mL de amostra Criotubo: 1 mL de amostra | Até o 15º dia de sintomas | Botijão de Nitrogênio Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Botijão de Nitrogênio Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. |
| | Fragmentos de Tecidos Coleta a partir da necropsia (óbito) Fígado, baço, Cérebro, pulmão, rins, coração e linfonodos | Criotubo: Fragmento de 1cm ³ | Obtenção das amostras deverá ser o mais precoce possível (ideal antes de 8 horas após óbito; no máximo em 24 horas) | Botijão de Nitrogênio ou Freezer -70° C | Botijão de Nitrogênio ou Gelo Seco |

Fonte: Guia para Diagnóstico Laboratorial em Saúde Pública MS/SVS/DAEVS- 2021

5. CHIKUNGUNYA

O diagnóstico laboratorial do chikungunya pode ser realizado por meio de métodos sorológicos (pesquisa de IgM e pesquisa de IgG), por métodos virológicos (isolamento viral e RT-PCR) e por exames anatomopatológicos (imunohistoquímica e histopatológico).

5.1. Pesquisa de anticorpos IgM para Chikungunya

5.1.1. Quando realizar a sorologia para Chikungunya?

A amostra de soro ou líquido deverá ser coletada **entre o 5º e o 90º dia do início dos sintomas** da doença.

5.1.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para a pesquisa de IgM para Chikungunya

Colher assepticamente 10 ml de sangue preferencialmente **entre o 5º e 90º dia após o início dos sintomas**. Utilizar seringa ou tubo a vácuo, sem anticoagulante, previamente identificado. Esperar a retração do coágulo por 30 minutos em temperatura ambiente. Centrifugar a 4.000 rpm por 10 minutos e separar 2 a 4 ml de soro. Transferir o soro assepticamente para tubo plástico, estéril, com tampa de rosca, devidamente identificado e conservar em freezer a -20°C . Alternativamente essa amostra poderá ficar armazenada sob refrigeração entre 2 a 8°C por no máximo 7 dias, sendo que após este período a amostra deve ser obrigatoriamente armazenada a -20°C . Transportá-la em caixa térmica com gelo reciclável. Não se recomenda a utilização de amostras de soro que apresentam contaminação microbiana, hemólise ou lipemia.

O rótulo deve conter de forma legível o nome do exame, nome completo do paciente por extenso, data da coleta, tipo de amostra e número da amostra (se 1ª ou 2ª amostra), usar etiquetas com tinta resistente aos meios de conservação.

Para assegurar a qualidade das amostras e garantir um diagnóstico em tempo hábil é necessário enviar as amostras ao LACEN-GO em no máximo 15 dias após a coleta (não estocar amostras).

ATENÇÃO: As amostras deverão estar acompanhadas de ficha epidemiológica devidamente preenchida e legível, sendo imprescindível o nome completo, data de nascimento, tipo de material, data da coleta, data do início de sintoma e ficha de cadastro no GAL.

Quadro 10. Pesquisa de IgM e IgG para Chikungunya

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|---------------------|---|---|---|---|
| IgM Chikungunya | Soro ou líquido A partir do 5º dia até no máximo 90º dia de sintomas | -20°C (Congelar) Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) por no máximo 7 dias, após esse período a amostra deve ser congelada | Ideal: Enviar em até 7 dias Gelo reciclável em caixa térmica | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para o diagnóstico de IgM para CHIKV. |

| | | | | |
|--------------------|--|---|---|--|
| IgG Chikungunya | Soro A partir do 15º dia de sintomas | -20°C (Congelar) Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) por no máximo 7 dias, após esse período a amostra deve ser congelada | Ideal: Enviar em até 7 dias Gelo reciclável em caixa térmica | Será realizado após avaliação dos critérios epidemiológicos e clínicos com IgM negativo |
|--------------------|--|---|---|--|

5.2. Teste de Isolamento viral para Febre Chikungunya

O isolamento viral para Chikungunya é realizado concomitantemente ao teste para Isolamento Viral da Dengue e segue o mesmo processo de cultivo celular e identificação por imunofluorescência utilizando anticorpos policlonais.

5.2.1. Quando realizar o isolamento viral para Chikungunya?

A amostra de sangue total (**sem anticoagulante**) deverá ser coletada **até o 5º dia do início dos sintomas** durante a fase de viremia da doença, que se inicia no período febril, dando-se preferência para coletas até o 3º dia de sintomas.

5.2.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para o isolamento viral para Chikungunya

a) Isolamento viral em amostras de sangue total:

Coletar assepticamente 2 ml de sangue total (**sem anticoagulante**), em pacientes **com até 5 dias** do início dos sintomas, preferencialmente até o 3º dia. As amostras deverão ser acondicionadas individualmente em tubos criogênicos (criotubos) com tampa de rosca, **fornecidos pelo LACEN-GO**, e devem ser devidamente identificados e armazenados imediatamente em botijão com nitrogênio líquido. Alternativamente essas amostras podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C), por no máximo 48h até serem transferidas para o botijão de nitrogênio ou encaminhadas para o LACEN-GO. **Nunca deixar estas amostras em temperatura ambiente.**

b) Isolamento viral em amostras de vísceras:

Devem ser coletados 02 fragmentos de aproximadamente 1cm³ de cada uma das seguintes vísceras: fígado, rins, baço, cérebro, pulmão, pâncreas e coração, em até no máximo 24h após o óbito, e acondicionadas individualmente em tubos criogênicos (criotubos), com tampa de rosca, fornecidos pelo LACEN-GO. Os tubos devem ser devidamente identificados e armazenados em um mesmo saco plástico (um saco plástico para cada paciente). Armazenar as amostras imediatamente em botijão com nitrogênio líquido.

Quadro 11. Amostras para Isolamento viral de chikungunya

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|---------------------|--|---|---|--|
| Isolamento viral | Sangue total Até 5º dia de sintomas (preferencialmente 3º dia) | Botijão com nitrogênio líquido Alternativa: 2 a 8°C (refrigerar) por no máximo 48h, após esse período a amostra deve ser acondicionada no botijão com N2 | Preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para o diagnóstico de Chikv por isolamento viral |
| Isolamento viral | Vísceras (1cm ³ de amostras in-natura acondicionadas em criotubos) | Botijão com nitrogênio líquido | Em botijão com nitrogênio líquido | |

As amostras para isolamento viral poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48h, podendo ser encaminhadas ao LACEN-GO em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior a 48h as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

5.3. RT-qPCR para Chikungunya

O teste de Detecção do RNA do vírus Chikungunya é direcionado para confirmação diagnóstica de casos notificados de Febre Chikungunya que apresentem quadro clínico característico da doença ou vínculo epidemiológico de infecção. No atual cenário de circulação de vários arbovírus, há relevância na avaliação laboratorial de todos os casos suspeitos e de diagnóstico diferencial para casos de óbitos encaminhados pelo SVO. A metodologia utilizada é RT-PCR em Tempo Real segundo LRN-IEC/CDC, 2016.

Para realização do exame a amostra deverá estar acompanhada de pedido médico da unidade de saúde e cópia da ficha de investigação de Febre Chikungunya e fichas de cadastro no GAL.

5.3.1. Quando realizar RT-qPCR para Chikungunya?

A amostra adequada para realização de RT-qPCR deve ser coletada **até 5 dias de início dos sintomas.**

5.3.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras biológicas para realização do teste de RT-PCR para Chikungunya

5.3.3. Tipos de Amostras:

- a) **Soro:** Venopunção em tubo sem anticoagulante, coletar **até 5 dias do início dos sintomas.**
- b) **LCR:** Punção lombar (punção espinal).
- c) **Fragmentos de Vísceras provenientes do SVO:** Coletar fragmentos de até 1cm³.

5.3.4. Material e conservação para envio

- a) **Soro (pelo menos 1 mL):** Separar o soro realizando a retração do coágulo em tempo mínimo possível. Armazenar de 2 a 8°C no máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO;

b) **LCR (pelo menos 1 mL):** Após coleta, o material deve ser colocado em criotubo estéril e devidamente rotulado com os dados do paciente. Armazenar de 2 a 8°C no máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.

c) **Fragmentos de Visceras provenientes do SVO:** Em caso de óbito suspeito, coletar fragmentos de fígado, baço, cérebro, rim, linfonodo, coração e pulmão. Outras amostras poderão ser coletadas de acordo com critério médico;

5.3.5. Acondicionamento e Transporte:

As amostras deverão ser acondicionadas em tubos plásticos resistente a baixas temperaturas (criotubos), novos com tampa de rosca, devidamente rotulados e lacrados. Os tubos devem suportar congelamento a baixas temperaturas.

Excepcionalmente, as amostras de soro e líquido poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48 horas, podendo ser encaminhadas ao LACEN em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo e garanta-se a manutenção da amostra na referida temperatura. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior às 48 horas as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

O transporte das amostras deverá ser realizado preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido ou gelo reciclável em caixas térmicas para amostras que ficaram refrigeradas entre 2 a 8°C por até 48 horas.

Quadro 12. Orientações de Coleta e Envio de Amostras para diagnóstico molecular de Chikungunya por RT-qPCR

| Tipo de diagnóstico | Tipo de espécime biológico | Recipiente/ Volume | Período para coleta | Armazenamento/ Conservação | Transporte |
|---------------------|---|------------------------------|--------------------------|--|---|
| RT-qPCR | Soro Obtenção de amostras: punção venosa (casos graves) ou punção intracardíaca (óbito) | Criotubo: 1 mL de amostra | 1º ao 5º dia de sintomas | Botijão de Nitrogênio Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Botijão de Nitrogênio Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até |

| | | | | | |
|--|--|---|--|---|--|
| | | | | | envio ao LACEN-GO. |
| | <p>Líquor</p> <p>Punção lombar ou coleta a partir da necropsia (óbito)</p> | <p>Criotubo: 1 mL de amostra</p> | <p>Complicações neurológicas até 15 dias do início dos sintomas (casos graves)</p> <p>Logo após o óbito (ideal em até 8 horas)</p> | <p>Botijão de Nitrogênio</p> <p>Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO.</p> | <p>Botijão de Nitrogênio</p> <p>Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO.</p> |
| | <p>Fragmentos de Tecidos</p> <p>Coleta a partir da necropsia (óbito)</p> <p>Fígado, baço, Cérebro, pulmão, rins, coração e linfonodos</p> | <p>Criotubo: Fragmento de 1cm³</p> | <p>Logo após o óbito (ideal em até 8 horas)</p> | <p>Botijão de Nitrogênio ou Freezer -70° C</p> | <p>Botijão de Nitrogênio ou Gelo Seco</p> |

Fonte: Guia para Diagnóstico Laboratorial em Saúde Pública MS/SVS/DAEVS- 2021

6. MAYARO

O diagnóstico laboratorial do Mayaro pode ser realizado por meio de métodos sorológicos (pesquisa de IgM) e por métodos virológicos (isolamento viral e RT-PCR).

6.1. Pesquisa de anticorpos IgM para Mayaro

6.1.2. Quando realizar a sorologia para Mayaro?

A amostra de soro ou líquido deverá ser coletada **entre o 5º e o 90º dia do início dos sintomas** da doença.

6.1.3. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para a Pesquisa de IgM para Mayaro

Colher assepticamente 10 ml de sangue preferencialmente entre o **5º e 90º dia após o início dos sintomas**. Utilizar seringa ou tubo a vácuo, sem anticoagulante, previamente identificado. Esperar a retração do coágulo por 30 minutos em temperatura ambiente. Centrifugar a 4.000 rpm por 10 minutos e separar 2 a 4 ml de soro. Transferir

o soro assepticamente para tubo plástico, estéril, com tampa de rosca, devidamente identificado e conservar em freezer a -20°C . Alternativamente essa amostra poderá ficar armazenada sob refrigeração entre 2 a 8°C por no máximo 7 dias, sendo que após este período a amostra deve ser obrigatoriamente armazenada a -20°C . Transportá-la em caixa térmica com gelo reciclável. Não se recomenda a utilização de amostras de soro que apresentam contaminação microbiana, hemólise ou lipemia.

O rótulo deve conter de forma legível o nome do exame, nome completo do paciente por extenso, data da coleta, tipo de amostra e número da amostra (se 1^a ou 2^a amostra), usar etiquetas com tinta resistente aos meios de conservação.

Para assegurar a qualidade das amostras e garantir um diagnóstico em tempo hábil é necessário enviar as amostras ao LACEN-GO em no máximo 15 dias após a coleta (não estocar amostras).

ATENÇÃO: As amostras deverão estar acompanhadas de ficha epidemiológica devidamente preenchida e legível, sendo imprescindível o nome completo, data de nascimento, tipo de material, data da coleta, data do início de sintoma e ficha de cadastro no GAL.

Quadro 13. Pesquisa de IgM para Mayaro

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|---------------------|--|---|---|--|
| IgM Mayaro | Soro ou Líquor A partir do 5º dia até no máximo 90º dia de sintomas | -20°C (Congelar) Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) por no máximo 7 dias, após esse período a amostra deve ser congelada | Ideal: Enviar em até 7 dias Gelo reciclável em caixa térmica | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para o diagnóstico de IgM para MAYV. |

6.2. Teste de Isolamento viral para Mayaro

O isolamento viral para Mayaro é realizado concomitantemente ao teste para Isolamento Viral da Dengue e segue o mesmo processo de cultivo celular e identificação por imunofluorescência utilizando anticorpos policlonais.

6.2.1. Quando realizar o isolamento viral para Mayaro?

A amostra de sangue total (**sem anticoagulante**) deverá ser coletada **até o 5º dia do início dos sintomas** durante a fase de viremia da doença, que se inicia no período febril, dando-se preferência para coletas até o 3º dia de sintomas.

6.2.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras para o isolamento viral de mayaro.

a) Isolamento viral em amostras de sangue total:

Coletar assepticamente 2 ml de sangue total (**sem anticoagulante**), em pacientes **com até 5 dias** do início dos sintomas, preferencialmente até o 3º dia. As amostras deverão ser acondicionadas individualmente em tubos criogênicos (criotubos) com tampa de rosca, **fornecidos pelo LACEN-GO**, e devem ser devidamente identificados e armazenados imediatamente em botijão com nitrogênio líquido. Alternativamente essas amostras podem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C), por no máximo 48h até serem transferidas para o botijão de nitrogênio ou encaminhadas para o LACEN-GO. **Nunca deixar estas amostras em temperatura ambiente.**

b) Isolamento viral em amostras de vísceras:

Devem ser coletados 02 fragmentos de aproximadamente 1cm³ de cada uma das seguintes vísceras: fígado, rins, baço, cérebro, pulmão, pâncreas e coração, em até no máximo 24h após o óbito, e acondicionadas individualmente em tubos criogênicos (criotubos), com tampa de rosca, fornecidos pelo LACEN-GO. Os tubos devem ser devidamente identificados e armazenados em um mesmo saco plástico (um saco plástico para cada paciente). Armazenar as amostras imediatamente em botijão com nitrogênio líquido.

Quadro 14. Amostras para Isolamento viral de Mayaro

| Tipo de diagnóstico | Coleta | Armazenamento | Transporte | Observações |
|---------------------|--|---|---|---|
| Isolamento viral | Sangue total Até 5º dia de sintomas (preferencialmente 3º dia) | Botijão com nitrogênio líquido Alternativa: 2 a 8°C (refrigerar) por no máximo 48h, após esse período a amostra deve ser acondicionada no botijão com N2 | Preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Seguir rigorosamente os critérios de seleção dos pacientes elegíveis para o diagnóstico por isolamento viral |
| Isolamento viral | Vísceras (1cm ³ de amostras in-natura acondicionadas em criotubos) | Botijão com nitrogênio líquido | Em botijão com nitrogênio líquido | |

As amostras para isolamento viral poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48h, podendo ser encaminhadas ao LACEN-GO em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior a 48h as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

6.3. RT-qPCR para Mayaro

O diagnóstico molecular do vírus Mayaro é realizado através da técnica RT-PCR em tempo real e é recomendado para fase inicial dos sintomas (viremia) em amostras de soro. O RNA do vírus pode ser identificado no soro ou fragmento de tecidos provenientes de óbitos suspeitos, encaminhados pelo SVO.

No atual cenário de circulação de vários arbovírus na região centro-oeste, há relevância na avaliação laboratorial de todos os casos suspeitos e de diagnóstico diferencial para casos de óbitos encaminhados pelos SVO. A metodologia utilizada é RT-PCR em Tempo Real segundo LRN-IEC, 2016.

Para realização do exame a amostra deverá estar acompanhada de cópia da ficha de investigação identificada e ficha de cadastro no GAL.

6.3.1. Quando realizar *RT-qPCR* para Mayaro?

A amostra adequada para realização de RT-qPCR deve ser coletada **até 6 dias de início dos sintomas.**

6.3.2. Coleta, identificação, acondicionamento e transporte de amostras biológicas para realização do teste de RT-qPCR para Mayaro

6.3.3. Tipos de Amostras e Conservação:

- a) **Soro:** Venopunção em tubo sem anticoagulante, colher do **1º até 6º dias do início dos primeiros sintomas.** Armazenar de 2 a 8°C no máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.
- b) **Urina:** Proceder a coleta até o 15º dia do início dos sintomas e encaminhar alíquota de no mínimo 1 mL em criotubo ou de no mínimo 3 mL em tubo cônico tipo Falcon. Armazenar de 2 a 8°C no máximo 48h, após 48h conservar em botijão com nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.
- c) **Fragmentos de Vísceras provenientes do SVO:** Em caso de óbito, coletar fragmento de fígado, baço, cérebro, rim, coração, linfonodo e pulmão (Coletar fragmentos de até 1cm³). Outras amostras, como LCR ou sangue *post mortem*, poderão ser coletadas de acordo com critério médico. Os fragmentos deverão ser acondicionados em criotubos distintos e identificados de acordo com o sítio coletado. Armazenar em botijão de nitrogênio líquido até o envio ao LACEN-GO.

6.3.4. Acondicionamento e Transporte:

As amostras deverão ser acondicionadas em tubos plásticos resistente a baixas temperaturas (criotubos), novos com tampa de rosca, devidamente rotulados e lacrados. Os tubos devem suportar congelamento a baixas temperaturas.

Excepcionalmente, as amostras de soro e urina poderão ficar refrigeradas entre 2 a 8°C por no máximo 48 horas, podendo ser encaminhadas ao LACEN em caixas térmicas contendo gelo reciclável desde que não ultrapasse este tempo e garanta-

se a manutenção da amostra na referida temperatura. É obrigatório registrar o horário e data de coleta da amostra. Para um período superior às 48 horas as amostras devem ser armazenadas obrigatoriamente em botijão de nitrogênio líquido.

O transporte das amostras deverá ser realizado preferencialmente em botijão com nitrogênio líquido ou gelo reciclável em caixas térmicas para amostras que ficaram refrigeradas entre 2 a 8°C por até 48 horas.

Quadro 15. Orientações de coleta, conservação e transporte das amostras para diagnóstico molecular por RT-qPCR de Febre do Mayaro.

| Tipo de diagnóstico | Tipo de material | Volume | Período da Coleta | Armazenamento/conservação | Transporte |
|---------------------|---|--|--|--|--|
| RT-qPCR | Soro Punção venosa (casos graves) ou punção intracardíaca (óbito) | Criotubo: 1 mL de amostra | Coletar o sangue sem anticoagulante entre 1 e 5 dias após o início dos sintomas. | Botijão de Nitrogênio Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Botijão de Nitrogênio Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. |
| | Urina | Tubo tipo Falcon: 3 mL de amostra Criotubo: 1 mL de amostra | Até o 15º dia de sintomas | Botijão de Nitrogênio Alternativa: 2 a 8°C (Refrigerar) Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. | Botijão de Nitrogênio Alternativa: Gelo reciclável em caixa térmica para amostras armazenadas 2 a 8°C. Máx. 48h até envio ao LACEN-GO. |
| | Fragmentos de Tecidos Coleta a partir da necropsia (óbito) Fígado, baço, Cérebro, pulmão, rins, coração e linfonodos | Criotubo: Fragmento de 1cm ³ | Obtenção das amostras deverá ser o mais precoce possível (ideal antes de 8 horas após óbito; no máximo em 24h) | Botijão de Nitrogênio ou Freezer -70° C | Botijão de Nitrogênio ou Gelo Seco |

Fonte: Guia para Diagnóstico Laboratorial em Saúde Pública MS/SVS/DAEVS- 2021

SESSÃO B
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM CASO DE
ÓBITO SUSPEITO DE INFECÇÃO POR
ARBOVÍRUS

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL EM CASO DE ÓBITO SUSPEITO DE INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS

Serão testadas de acordo com a hipótese diagnóstica levando-se em consideração as características e condições de cada amostra e as possibilidades das metodologias.

7. Instruções para a coleta de amostras em situação de óbito

Recomendações para os óbitos suspeitos de arboviroses sem o diagnóstico etiológico prévio (ANEXO D).

Em se tratando de óbito devem-se garantir todas as amostras necessárias para a investigação laboratorial e confirmação diagnóstica, sendo que as amostras preferenciais devem ser sangue total, soro e vísceras, podendo em alguns casos serem utilizadas outras amostras como líquido, líquido ascítico, e outros.

- 1- **Sangue total e soro** - para obtenção de sangue total e soro deve ser coletado sangue por punção intra-cárdica em até 8h após o óbito ou em vasos de grande calibre como a femoral e jugular, obtendo-se assim:

- a) **Duas amostras de soro.**

Utilizadas para sorologias (IgM e/ou NS1) e RT-PCR. Sendo que uma amostra deve ser **obrigatoriamente** armazenada em botijão de nitrogênio (com um mínimo de 12cm de nitrogênio) para a técnica de RT-PCR e a outra amostra **pode ser** armazenada em botijão de nitrogênio ou sob refrigeração em temperatura entre 2 a 8°C, para as sorologias. Amostras fortemente hemolisadas podem impossibilitar as análises sorológicas.

- b) **Uma amostra de sangue total.**

Utilizada para a técnica de isolamento viral para dengue, febre amarela, chikungunya e/ou mayaro. Sendo que esta amostra pode ser armazenada entre 2 a 8°C por no máximo 48h e para período maior, obrigatoriamente

armazenada em botijão de nitrogênio (com um mínimo de 12cm de nitrogênio).

- 2- **Vísceras** - devem ser coletadas amostras de fígado, pulmões, rins, baço, coração, pâncreas e cérebro, sendo estes os espécimes de escolha para as análises anatomopatológicas, RT-PCR e isolamento viral em vísceras. Coletar no mínimo 3 (três) fragmentos de cada tecido com dimensões aproximadas de 1cm.

Estes fragmentos devem ser segregados e armazenados da seguinte forma:

a) **Vísceras “in natura” para isolamento viral e RT-PCR - 02 amostras de cada sítio**

Acondicionar separadamente (por sítio) em **criotubos**, que devem estar devidamente identificados com o nome do paciente, data da coleta e tipo de amostra. Não é necessário nenhum conservante ou meio de cultura. Estes criotubos devem ser armazenados imediatamente em botijão de nitrogênio (mínimo de 12 cm de nitrogênio).

b) **Vísceras para anatomopatológico (histopatológico e Imunohistoquímica) – 01 amostra de cada sítio**

Acondicionar separadamente (por sítio) em tubos tipo falcon, preferencialmente de 15 ml, contendo formalina tamponada a 10% ou em blocos de parafina. O volume de formalina tamponada a 10% deve ser suficiente para cobrir em até duas vezes a amostra acondicionada, não devendo ficar nenhuma parte da amostra fora do líquido. Os tubos ou blocos de parafina devem estar devidamente identificados com o nome do paciente, data da coleta e tipo de amostra, devendo ser armazenados à temperatura ambiente.

3- Líquidos cavitários – pleural, ascítico e pericárdio.

Coletar líquidos cavitários para realização de RT-PCR. As amostras devem ser acondicionadas em criotubos devidamente identificados e armazenados em botijão contendo nitrogênio líquido.

Vale ressaltar que as amostras coletadas de órgãos diferentes devem ser acondicionadas em recipientes separados e identificados – um tubo para cada tipo de amostra e exame a que se destina, por exemplo: dois criotubos com fragmentos de pulmão (deverá ser armazenados no botijão de nitrogênio e encaminhados para RT-PCR e isolamento viral) e outro tubo tipo falcon com formalina contendo outro fragmento de pulmão (armazenado em temperatura ambiente para os exames anatomopatológicos).

Espécimes de qualquer outro órgão, que apresentarem alteração macroscópica, poderão ser encaminhados para investigação de etiologia viral.

Todas as amostras, ao serem encaminhadas para o LACEN-GO, devem estar acompanhadas da ficha do SVO, ficha de notificação (SINAN), ficha de solicitação de exame anatomopatológico, ficha impressa do cadastro no GAL, lista impressa de exames encaminhados para o LACEN (GAL) e o laudo médico ou histórico do paciente (quando houver).

As amostras que não são processadas no LACEN-GO, como as vísceras para o teste anatomopatológico, são encaminhadas ao Laboratório de Referência Nacional para diagnóstico de arboviroses.

O acompanhamento e a notificação dos casos de óbitos, no LACEN-GO, são realizados pelo Núcleo de Vigilância Laboratorial.



Secretaria de
Estado da
Saúde



SESSÃO C

BOTIJÃO DE NITROGÊNIO

8. Manuseio do botijão de nitrogênio

O botijão é um recipiente térmico com isolamento a vácuo para conservar as amostras congeladas a uma temperatura de -196°C (cento e noventa e seis graus centígrados negativos) por tempo indeterminado, para tanto deve receber nitrogênio líquido, desde que se mantenha um determinado nível mínimo, abastecendo-o periodicamente.

O botijão deve ser manipulado com o máximo cuidado para evitar danos que possam resultar em prejuízos. Para diminuir os riscos com o botijão, é aconselhável a construção de uma caixa de madeira para seu acondicionamento. O botijão não pode sofrer choques (batidas), nem movimentos muito bruscos, além de tombar o que causaria o derramamento do seu conteúdo.

O nitrogênio líquido evapora constantemente, o técnico deve estar atento para evitar perda de amostras por falta de nitrogênio.

Deve-se medir regularmente o seu nível com medidor apropriado (régua). Consumo elevado de nitrogênio pode indicar problemas com o botijão, assim como a formação de gelo ou umidade condensada sobre qualquer superfície externa, também pode indicar defeito ou estar danificado (caso haja formação de gelo no gargalo, prendendo a tampa, não tente removê-la com objetos pontudos, nem exagerar na força).

É bom lembrar que muito próximo à boca do botijão o material armazenado poderá se expor a temperaturas que poderão causar danos à qualidade deste material, para tanto é necessário à utilização da pinça. Desta forma apenas o material a ser retirado estará em contato com a temperatura externa.

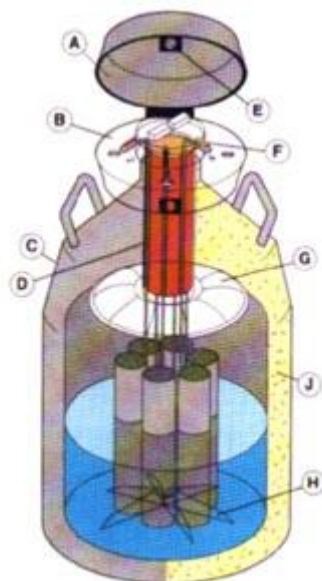


Figura 1. Representação esquemática de um botijão de nitrogênio

- A- Tampa protetora
- B- Apoio da tampa
- C- Estrutura de alumínio
- D- Pescoço em isolante
- E- trava da tampa
- F- Canecas identificadas
- G- Sistema químico para retenção do vácuo
- H- Apoio das canecas
- J- Super Isolamento a vácuo

8.1. Cuidados com o botijão de nitrogênio

- Manter o botijão em ambiente ventilado, seco, ao abrigo de raios solares, fechando-o apenas com sua própria tampa;
- Não bater ou tombar, pois pode provocar a perda do vácuo, mesmo sem apresentar danos externos;
- O seu conteúdo é líquido e o manuseio incorreto pode causar sérios ferimentos (evite contato com as partes do corpo);
- Retirar as racks vazias, para diminuir o consumo de nitrogênio e facilitar seu manejo;
- Nunca vedar a tampa para impedir a evaporação do líquido;
- Use apenas adesivo para fixar qualquer tipo de identificação;
- Para resfriar o botijão coloque cuidadosamente 0,5 a 1,0 litro de nitrogênio com auxílio de um funil, aguarde meia hora e em seguida complete o nível de forma lenta. Aguardar 24 horas para ver a taxa de resfriamento;

- Não transportar o botijão solto em carrocerias de veículos (deve ser transportado em caixas de madeira, preso na posição vertical, mesmo quando estiver vazio; ao transportar em veículos fechados, observar que haja ventilação;
- Nunca derrame o líquido em recinto fechado, pois pode provocar asfixia pela redução da quantidade de oxigênio;
- Evite o contato direto com o nitrogênio líquido ou peças metálicas que estejam em contato com o líquido;
- Movimentá-lo sempre com 2 pessoas;
- Medir regularmente o nível de nitrogênio;
- **Nunca deixar atingir níveis inferiores a 12 cm de nitrogênio líquido.**

O LACEN-GO é responsável pelo abastecimento dos botijões de nitrogênio líquido. Esse procedimento será realizado junto aos representantes das Regionais de Saúde do Estado.

8.2. DISTRIBUIÇÃO DE TEMPERATURAS NO BOTIJÃO

É bom lembrar que muito próximo à boca do botijão o material armazenado poderá se expor a temperaturas que poderão causar danos à qualidade deste material, para tanto é necessário à utilização da pinça. Desta forma apenas o material a ser retirado estará em contato com a temperatura externa.

8.3. TABELA DE VERIFICAÇÃO DE NÍVEL E PESO DE NITROGÊNIO LÍQUIDO

Como é de conhecimento de todos, de tempos em tempos os botijões devem ser reabastecidos de nitrogênio. Este tempo de reabastecimento varia de acordo com o grau de uso do botijão, bem como com o tamanho do botijão.

Para que o manipulador tenha uma base da quantidade de litros necessários para o reabastecimento, basta olhar a tabela abaixo e, após medir o nível de nitrogênio restante no botijão, calcular a quantidade em litros que irá necessitar para o completo reabastecimento.

Vale ressaltar que o manipulador deve conhecer o grau de evaporação do seu botijão, por meio de medições periódicas e manter uma rotina de abastecimento.

VOLUME EXISTENTE (LITROS)

| NÍVEL (CM) | SC 20/20 | XC 33/22 | XC 43/28 | XC 47-11 |
|------------|----------|----------|----------|----------|
| | SC 20/15 | XC 34/18 | | |
| | | SC 33/32 | | |
| | | SC 33/26 | | |
| 38,1 | – | – | – | 47,2 |
| 36,8 | – | – | – | – |
| 35,6 | – | 34,9 | 42,2 | 45,4 |
| 34,3 | – | 34,6 | 42,0 | 43,9 |
| 33,0 | 20,7 | 34,0 | 41,3 | 42,2 |
| 30,5 | 19,0 | 31,5 | 38,6 | 38,6 |
| 27,9 | 17,3 | 28,6 | 35,1 | 35,1 |
| 25,9 | 15,6 | 25,8 | 31,6 | 31,6 |
| 22,9 | 13,9 | 23,0 | 28,1 | 28,1 |
| 20,5 | 12,2 | 20,2 | 24,6 | 24,6 |
| 17,8 | 10,5 | 17,4 | 21,1 | 21,1 |
| 15,2 | 8,8 | 14,6 | 17,6 | 17,6 |
| 12,7 | 7,1 | 11,8 | 14,1 | 14,1 |
| 10,2 | 5,4 | 9,0 | 10,6 | 10,6 |
| 7,6 | 3,7 | 6,2 | 7,1 | 7,1 |
| 5,1 | 2,0 | 3,4 | 3,6 | 3,6 |
| 2,54 | 0,6 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |

Fonte: Tabela de nível do Nitrogênio fornecida pela M.V.E.

Tabela de conversão fornecida pela Air Liquid

Também podemos fazer a conversão de litros para quilos ou vice-versa. Para isto basta saber que 1 litro equivale a 0,808 Kg de Nitrogênio. Ou 1 Kg é igual a 1,238 litros de Nitrogênio.

EXEMPLO: Se o seu botijão é um SC 20/20 e está com 10,2 cm de Nitrogênio, significa que possui 5,4 litros restantes. Se a capacidade é de 20 litros, faltam aproximadamente 15 litros para completá-lo, ou 12,12 Kg de Nitrogênio (15 X 0,808).



Secretaria de
Estado da
Saúde



SESSÃO D

FLUXO DE RESULTADOS

9. FLUXO DE RESULTADOS

O sistema GAL já está implantado em todo o estado de Goiás, sendo que os municípios e unidades estaduais devem cadastrar todos os exames solicitados ao LACEN-GO neste sistema. Os laudos, após liberação, ficarão disponíveis imediatamente no próprio sistema para impressão destes pelos solicitantes, diminuindo o tempo de espera e otimizando os resultados.

Para realização do anatomopatológico e imunohistoquímica, o LACEN-GO encaminha as amostras para o Laboratório de Referência Nacional em Arboviroses. Os resultados provenientes deste laboratório estão disponíveis diretamente no sistema GAL.

Além disso, o “Núcleo de Vigilância Laboratorial” do LACEN-GO consolida todos os resultados das amostras de óbitos que entraram no laboratório em uma planilha que é enviada ao CIESVS/Goiás e a Coordenação Estadual de Arboviroses semanalmente ou sempre que houver um resultado positivo de agravo de notificação imediata conforme Portaria GM/MS nº 420, de 02/03/2022.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRASIL. Manual de técnicas para o diagnóstico laboratorial de dengue. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. *Guia de Vigilância em Saúde*, 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Guia para diagnóstico laboratorial em saúde pública: orientações para o sistema nacional de laboratórios de saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Guia de Vigilância em Saúde. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Reunião Nacional de Atualização da Vigilância Epidemiológica da Dengue. Estudo de caso – Aplicação da nova classificação dos casos de dengue. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

IGARASHI A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J. Gen. Virol* 1978;40:531-44

KUNO G; GOMEZ I; GUBLER D.J. Detecting artificial antidengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36:153–9.

LANCIOTTI R.S; CALISHER C.H; GUBLER D.J; CHANG G.J, VORNDAM A.V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30:545–51.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New ed., TDR: World Health Organization, Geneva, x, 2009. 147 pp.

VANZIN, I.M. Inseminação artificial e manejo reprodutivo dos bovinos. Disponível em: http://www.inseminacaoartificial.com.br/Manejo_botijao.htm. Acesso em: 28 mar. 2017.



Secretaria de
Estado da
Saúde



ANEXOS



ANEXO A: FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DIAGNÓSTICO DE DENGUE – SOROLOGIA IgM

LACEN

Laboratório Central de Saúde Pública-GO

Secretaria Estadual de Saúde
Laboratório Estadual de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros
Av. Contorno, nº 3556 – Jardim Bela Vista
Goiânia-Goiás
Telefone: (62) 3201-3888

Título: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DIAGNÓSTICO DE DENGUE (AQDD)- SOROLOGIA DENGUE IgM

Número:
SEVIR 51

1- Identificação da Instituição:

Nome: _____
Endereço: _____
CEP: _____ Cidade/Estado: _____
Telefone: _____ Celular: () _____
E-mail: _____
Diretor de Instituição: _____

2- Enzimaimunoensalo (ELISA) Dengue IgM:

Kit comercial utilizado no município: _____
Data da validade do kit: _____
Lote: _____
Técnico responsável: _____

| DATA | NÚMERO DA AMOSTRA | LEITURA DA AMOSTRA (DO) | VALOR DE CORTE (CO) | RESULTADO | RESULTADOS DO LACEN |
|------|-------------------|-------------------------|---------------------|-----------|---------------------|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Kit comercial utilizado no município: _____
Data da validade do kit: _____
Lote: _____
Técnico responsável: _____

Desempenho da análise: () SATISFATÓRIO () INSATISFATÓRIO () PARCIALMENTE SATISFATÓRIO

Observações: _____

Data: ____ / ____ / ____

ANEXO B: FLUXO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE ARBOVIROSES-LACEN-GO (testes realizados no período de viremia: Isolamento Viral, NS1Ag e RT-PCR)

Paciente com quadro clínico que atenda às definições de caso suspeito de infecção por: Dengue, Zika, Chikungunya, Mayaro ou Febre Amarela.

AMOSTRAS

Paciente com até 05 dias de sintomas (SORO, SANGUE TOTAL e/ou outros líquidos corporais)
Paciente com até 14 dias de sintomas (URINA – pesquisa Zika)

Observação: todas as amostras deverão ser coletadas preferencialmente até o 3º dia

Isolamento Viral

(Dengue, Febre Amarela Chikungunya e Mayaro)

RT-PCR

(Dengue, Zika, Chikungunya, Mayaro e Febre Amarela)

02 amostras de soro:

- NS1Ag (Dengue) / RT-PCR

01 amostra de sangue total:

- isolamento viral

01 amostra de soro: amostra prioritária

Amostras de outros líquidos corporais: **Urina, LCR, Derrames cavitários e outros.**

CONSERVAÇÃO

Botijão de nitrogênio com no mínimo 12cm de altura
 (se não houver o botijão a amostra pode ser refrigerada 2 a 8°C por no máximo 48h)

ENVIO AO LACEN

- Amostras
- Fichas de notificação
- Fichas de cadastro no GAL
- Lista de exames encaminhados para a rede de laboratórios (GAL)

Resultado NS1Ag
 Liberação em 07 dias

Resultado RT-PCR
 Liberação em 21 dias

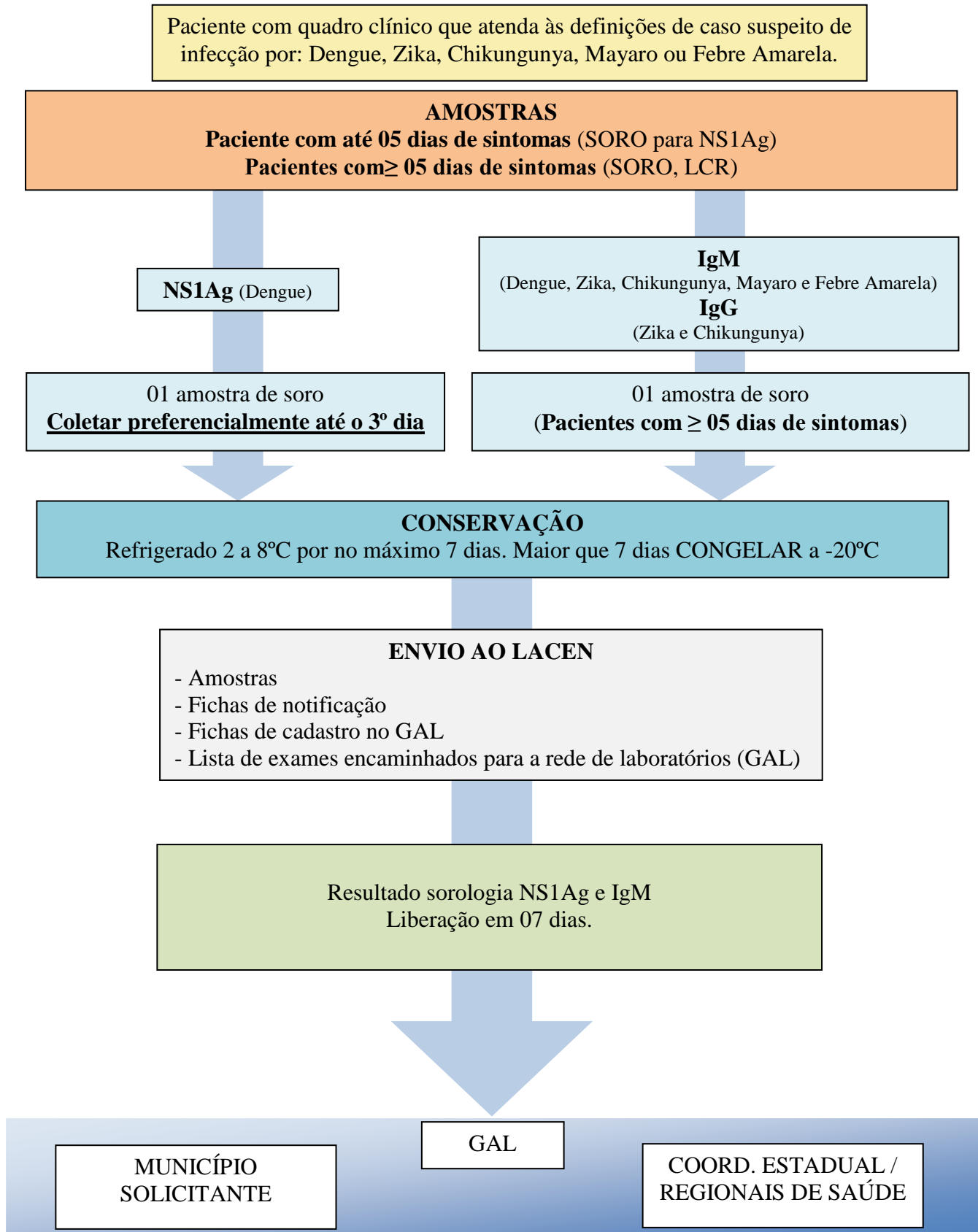
Resultado Isolamento Viral
 Liberação em 30 dias

MUNICÍPIO SOLICITANTE

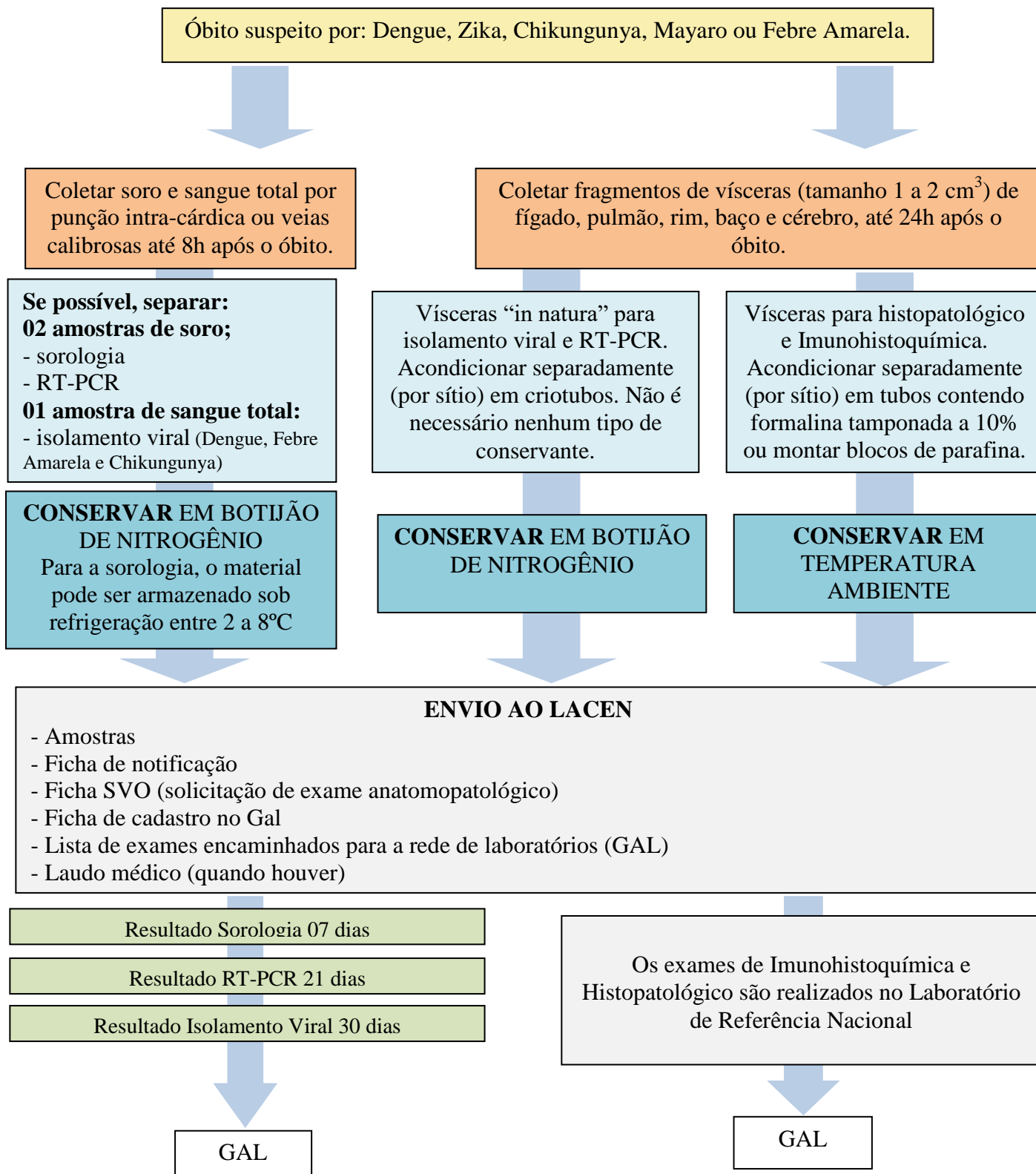
GAL

COORD. ESTADUAL / REGIONAIS DE SAÚDE

ANEXO C: FLUXO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE ARBOVIROSES-LACEN-GO (testes sorológicos: NS1Ag, IgM e IgG)



ANEXO D: FLUXO DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL EM CASO DE ÓBITO SUSPEITO DE INFEÇÃO POR ARBOVÍRUS –LACEN-GO



NÚCLEO DE VIGILÂNCIA LABORATORIAL, COORDENAÇÃO ESTADUAL, REGIONAIS DE SAÚDE E MUNICÍPIO SOLICITANTE