

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil

Brasília – DF
2016



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis

Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil

Brasília – DF
2016



2016 Ministério da Saúde.



Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <www.saude.gov.br/bvs>. O conteúdo desta e de outras obras da Editora do Ministério da Saúde pode ser acessado na página: <<http://editora.saude.gov.br>>.

Tiragem: 1ª edição – 2016 – versão eletrônica

Elaboração, edição e distribuição:

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Vigilância em Saúde

Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis

Coordenação-Geral de Doenças Transmissíveis

Esplanada dos Ministérios, bloco G, Edifício Sede, 1º andar, sala 134

CEP: 70058-900 – Brasília/DF

Site: www.saude.gov.br/svs

E-mail: svs@saude.gov.br

Organização:

Coordenação-Geral de Doenças Transmissíveis (CGDT/Devit/SVS)

Colaboração:

Ana Carolina de Lacerda Sousa, Ana Cláudia Medeiros de Souza, Cláudio Maierovitch Pessanha Henriques, Daiana Araujo da Silva, Emerson Luiz Lima Araujo, Erica Tatiane da Silva; Fabiano Marques Rosa, Fernando Couto Motta, Francisco José de Paula Júnior,

Juliana de Almeida Leite, Líbia Roberta de Oliveira Souza, Maria de Lourdes Aguiar Oliveira; Mariana Pastorello Verotti, Marilda Mendonça de Siqueira, Mirleide Cordeiro Santos, Swamy Lima Palmeira, Terezinha Maria de Paiva, Thayssa Neiva da Fonseca, Walquiria Aparecida Ferreira de Almeida, Wyller Alencar de Mello.

Produção:

Núcleo de Comunicação (Nucom/SVS)

Diagramação: Sabrina Lopes

Agradecimento:

O Ministério da Saúde agradece à equipe do Laboratório de Referência Nacional (Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo da Fiocruz) pela disponibilização dos POPs utilizados para padronização dos protocolos neste guia.

Equipe editorial:

Normalização: Luciana Cerqueira Brito – Editora MS/CGDI

Revisão: Khamila Silva e Tatiane Souza – Editora MS/CGDI

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.

Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

64 p. : il.

Modo de acesso: World Wide Web: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_laboratorial_influenza_vigilancia_influenza_brasil.pdf>

ISBN 978-85-334-2402-9

1. *Influenza* humana – vigilância. 2. *Influenza* humana – diagnóstico. 3. *Influenza* humana – epidemiologia. I. Título.

CDU 616.98

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2016/0139

Título para indexação:

Guide for Laboratory Influenza Surveillance Network in Brazil

LISTA DE ABREVIATURAS

AEQ	Avaliação Externa da Qualidade	NB1	Nível Biológico 1
ANF	Aspirado de nasofaringe	NB2	Nível Biológico 2
ASB	Albumina sérica bovina	NB3	Nível Biológico 3
CDC	<i>Center of Disease Control</i> – Centro de Controle de Doenças	NB4	Nível Biológico 4
CGLAB	Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública	NIC	Nacional Influenza Center
Ct	<i>Cycle threshold</i>	OMS	Organização Mundial da Saúde
EPC	Equipamento de proteção coletiva	PBS	Solução salina tamponada
EPI	Equipamento de proteção individual	POP	Procedimento Operacional Padrão
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz	PA	Pará
GISN	Global Influenza Surveillance Network	SG	Síndrome Gripal
HA	Hemaglutinina	Sislab	Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública
IAL	Instituto Adolfo Lutz	SNF	<i>Swab</i> de nasofaringe
IATA	Associação Internacional de Transporte Aéreo	SOF	<i>Swab</i> de orofaringe
IEC	Instituto Evandro Chagas	SP	São Paulo
IFI	Imunofluorescência Indireta	SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
Lacen	Laboratório Central de Saúde Pública	RJ	Rio de Janeiro
LRN	Laboratório de Referência Nacional	TA	Temperatura Ambiente
LRR	Laboratório de Referência Regional	TSA	Teste de Sensibilidade aos Antivirais
MTV	Meio de transporte viral	WHO	<i>World Health Organization</i>
NA	Neuraminidase		

Página intencionalmente branca

SUMÁRIO

1	VIGILÂNCIA DO VÍRUS INFLUENZA	7
1.1	INTRODUÇÃO	7
1.2	REDE LABORATORIAL PARA VIGILÂNCIA DE INFLUENZA	9
1.3	CONTRIBUIÇÕES DA VIGILÂNCIA VIROLÓGICA PARA SAÚDE PÚBLICA	10
2	OBJETIVOS DO GUIA DE VIGILÂNCIA LABORATORIAL	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	15
3.1	PLANEJAMENTO E REVISÃO CÍCLICA DAS ATIVIDADES LABORATORIAIS	15
3.2	BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS E BIOSSEGURANÇA	15
3.3	COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS CLÍNICAS	16
3.4	COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS <i>POST-MORTEM</i>	22
3.5	PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS CLÍNICAS	24
3.6	IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIO	30
3.7	IMUNOFLORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIO	34
3.8	EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO VIRAL	38
	3.8.1 Extração de Ácido Nucleico – Kit “ <i>QIAamp Viral RNA Mini Kit</i> ”	38
	3.8.2 Extração de Ácido Nucleico – Kit “ <i>High Pure Nucleic Acid Kit</i> ”	42
3.9	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	44

4 AQUISIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE INSUMOS	53
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	57
ANEXO A – FLUXOGRAMA DOS SISTEMAS DE INFORMAÇÕES	57
ANEXO B – FLUXOGRAMA DE ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS	58
ANEXO C – ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA INFLUENZA E OUTROS VÍRUS RESPIRATÓRIOS	59
ANEXO D – GUIA RÁPIDO DE COLETA DE AMOSTRA	60
LISTA DE CONTATOS	63

VIGILÂNCIA DO VÍRUS INFLUENZA

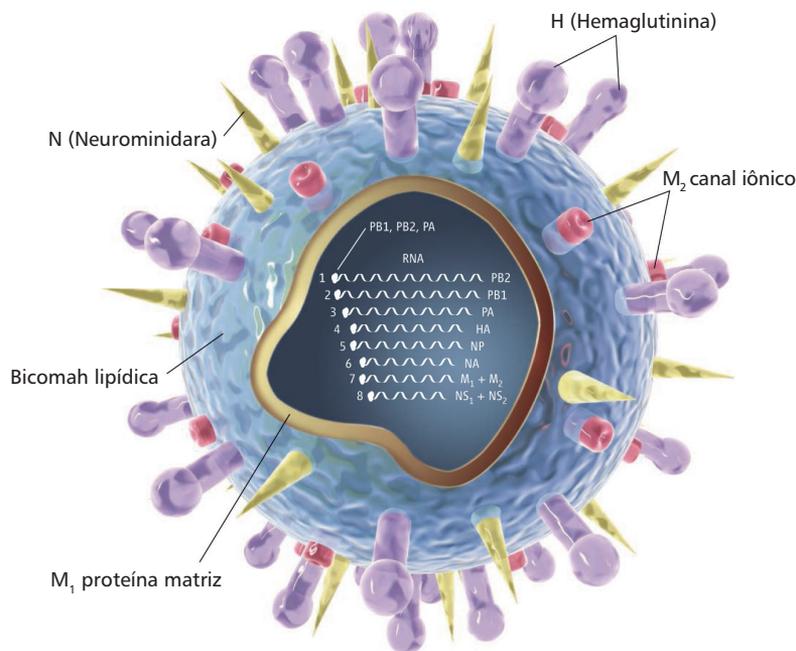
1.1 INTRODUÇÃO

A gripe ou influenza é uma doença infectocontagiosa aguda do trato respiratório, de distribuição global, causada pelo vírus da influenza. Pessoas de todas as idades são susceptíveis a infecção por estes vírus, entretanto, idosos, crianças, gestantes e pessoas com algumas comorbidades (cardiopatas, pneumopatas, hipertensos, diabéticos, obesos mórbidos, entre outros) possuem um risco maior de desenvolver complicações devido à infecção por influenza, responsável por cerca de meio milhão de óbitos anuais em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Os vírus da influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* e possuem genoma de RNA segmentado. Há três tipos de vírus da influenza: A, B e C. O vírus da influenza do tipo C está frequentemente associado a infecções respiratórias brandas, com pouco impacto na saúde pública e não está relacionado com epidemias. Os vírus da influenza tipos A e B são responsáveis por epidemias anuais, sendo os vírus da influenza tipo A os responsáveis pelas grandes pandemias. Os vírus da influenza do tipo A são classificados em subtipos de acordo com as diferenças antigênicas das glicoproteínas de superfície, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). A proteína HA está associada ao reconhecimento e à infecção das células do trato respiratório, onde o vírus se multiplica;

enquanto a proteína NA está envolvida na liberação das partículas virais da superfície das células infectadas (Figura 1). Até o momento, todos os 18 subtipos de HA e 11 de NA descritos foram identificados em aves (exceto H17 e 18, identificados em morcegos), alguns destes afetando também mamíferos (TONG et al., 2013). Entre estes, os subtipos A(H1N1) pdm09 e A(H3N2) circulam amplamente na população humana. Alguns vírus da influenza do tipo A de origem aviária também podem infectar humanos causando doença grave, como no caso do A(H5N1) e A(H7N9).

FIGURA 1
Representação esquemática da estrutura dos vírus influenza A e B com 8 segmentos de RNA que codificam 10 proteínas virais



Fonte: Ilustração de Chris Bickel/Science – Science, vol. 312, p. 380 (21 abril 2006) by AAAS. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/ufvjm/medidas-preventivas-contra-a-gripe-suna-vrus-h1n1>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

A principal característica dos vírus influenza é a sua capacidade de sofrer mudanças antigênicas, que podem ocorrer de duas maneiras:

Antigenic drift ou variação antigênica – resultante do acúmulo de mutações pontuais nos genes da HA e NA durante a replicação viral, levando a pequenas alterações nas glicoproteínas de superfície dos vírus. Estas alterações podem resultar em variantes capazes de escapar à resposta imunológica do hospedeiro, sendo esta uma das razões pela qual uma pessoa pode se infectar pelo vírus influenza várias vezes ao longo da vida. Devido a essa variação antigênica, a composição da vacina anti-influenza é revisada anualmente com base nos vírus circulantes.

Antigenic shift ou rearranjo antigênico – ocorre quando há uma completa troca de um ou mais segmentos do genoma viral resultando em grandes mudanças antigênicas. Como resultado de um rearranjo, pode surgir um novo subtipo viral, para o qual a população apresenta pouca ou nenhuma imunidade adquirida.

A vigilância de influenza foi iniciada em 1947, com o objetivo de monitorar os vírus circulantes e fornecer informações para subsidiar as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS). Atualmente, a Rede Global de Vigilância de Influenza da OMS (GISN, do inglês *WHO Global Influenza Surveillance Network*) é constituída de mais de 140 laboratórios em diferentes países, denominados Centros Nacionais de

Influenza (NIC – *National*), além de seis Centros Colaboradores (WHO CC). No Brasil, a implantação do Sistema de Vigilância Sentinela teve início em 2000 (BARROS et al., 2004).

1.2 REDE LABORATORIAL PARA VIGILÂNCIA DE INFLUENZA

O diagnóstico laboratorial e o conhecimento da circulação do vírus influenza são fundamentais para o desenvolvimento das atividades da vigilância da influenza. A rede de laboratórios é articulada com o intuito de produzir dados oportunos sobre o diagnóstico laboratorial para identificação dos agentes etiológicos, além de cumprir todas as etapas necessárias para o desenvolvimento das atividades da vigilância virológica da influenza, como identificação do agente etiológico, análise antigênica e genética, além de teste de resistência aos antivirais. A padronização de competências, fluxos e prazos permitem comparação de resultados e a operacionalização de um monitoramento sistemático dos dados gerados pela rede de laboratórios, com objetivo de subsidiar a tomada de decisão e de resposta em saúde pública referentes às ações de vigilância de influenza, além de gerar dados que serão utilizados pela GISN.

A rede nacional de laboratórios para vigilância de influenza faz parte do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (Sislab) (Portaria MS/SVS nº 2.031, de 23 de setembro de 2004), e é constituída por 27 Laboratórios Estaduais Centrais de Saúde Pública (Lacen), dois Laboratórios de Referência

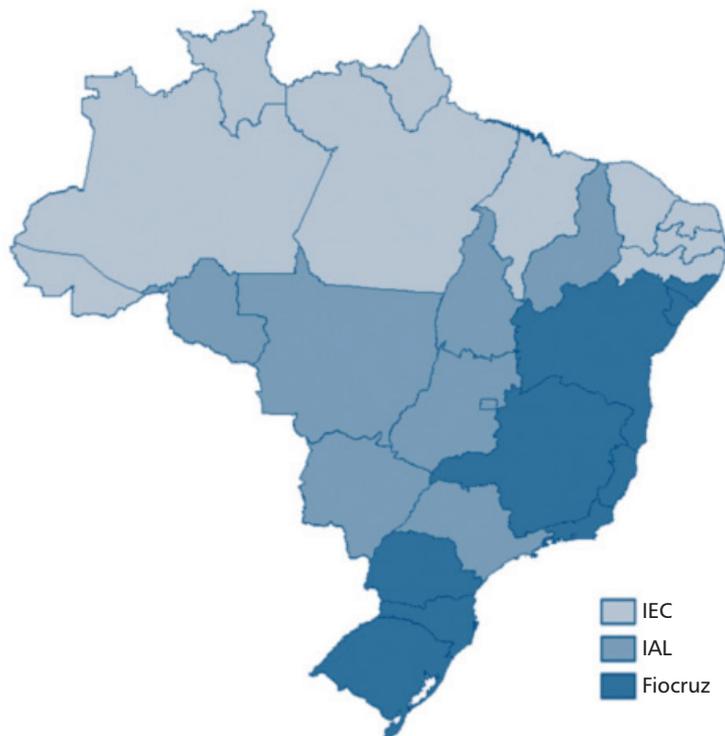
Regional (LRR) e um Laboratório de Referência Nacional (LRN). Os LRR e LRN são responsáveis pelas análises complementares às realizadas pelos Lacens que fazem parte da sua rede de abrangência (Figura 2). Para o Programa Nacional de Vigilância de Influenza, o Laboratório de Referência Nacional está localizado na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro/RJ, e os dois Laboratórios de Referência Regional estão localizados no Instituto Adolfo Lutz (IAL), em São Paulo/SP, e no Instituto Evandro Chagas (IEC), em Ananindeua/PA. Esses três laboratórios são credenciados na OMS como centros de referência para influenza (NIC, do inglês *National Influenza Center*), os quais fazem parte da rede global de vigilância da influenza (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Os Lacens são responsáveis pela base da informação utilizada para vigilância a partir da identificação do agente etiológico, tipagem e subtipagem de vírus influenza circulantes. Esses laboratórios realizam o processamento inicial das amostras coletadas, incluindo aliquotagem, estocagem e diagnóstico laboratorial viral. Um quantitativo das amostras processadas pelos Lacens é sistematicamente enviado para os Laboratórios de Referência para realização de análises complementares.

Os Laboratórios de Referência são responsáveis pela caracterização antigênica e genética dos vírus circulantes e identificação de novos subtipos, bem como o monitoramento da resistência aos antivirais. Como parte da rede global, esses laboratórios enviam, anualmente, isolados virais e amostras clínicas para o Centro de Controle e Prevenção de Doenças

(CDC, Atlanta, EUA), o Centro Colaborador da OMS das Américas, para subsidiar a seleção das estirpes virais para a composição da vacina anual pela OMS.

FIGURA 2
Áreas de Abrangência dos Laboratórios de Referência



Fonte: Ministério da Saúde.
Laboratórios de Referência Regional (LRR): Instituto Evandro Chagas (IEC); Instituto Adolfo Lutz (IAL). Laboratório de Referência Nacional (LRN): Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Para que os dados de vigilância virológica sejam utilizados de maneira eficiente, os resultados laboratoriais devem ser disponibilizados em tempo oportuno, de acordo com os prazos estabelecidos na Tabela 1.

TABELA 1
Metodologia e prazo máximo estabelecido entre o recebimento da amostra no laboratório (triagem) e liberação do resultado laboratorial

METODOLOGIA	PRAZO MÁXIMO
Identificação de agente etiológico, tipagem e subtipagem	7 dias
Teste de Sensibilidade aos Antivirais (TSA)	10 dias
Caracterização genética	21 dias
Caracterização antigênica	6 semanas

Fonte: Ministério da Saúde.

1.3 CONTRIBUIÇÕES DA VIGILÂNCIA VIROLÓGICA PARA SAÚDE PÚBLICA

A vigilância da influenza no Brasil é baseada nas informações geradas tanto pela rede de vigilância epidemiológica quanto pela rede laboratorial (vigilância virológica) da influenza do Ministério da Saúde. Dentro dessa rede laboratorial, os Lacens são responsáveis por analisar amostras coletadas de pacientes com Síndrome Gripal (SG) e Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) coletadas sistematicamente, possibilitando a

identificação e a caracterização dos vírus influenza circulantes no País. Análises complementares à identificação viral, tais com caracterizações antigênicas e genéticas, além de teste de sensibilidade a antivirais e isolamento viral, são realizadas pelos Laboratórios de Referência.

Os dados complementares das amostras isoladas que são enviadas pelos laboratórios de referência para o CDC, Centro Colaborador da OMS na Américas, subsidiam a tomada de decisão da composição anual da vacina contra influenza para o Hemisfério Sul. Adicionalmente, os dados gerados pela vigilância virológica são importantes para o monitoramento da evolução dos vírus influenza circulantes, assim como detecção de possíveis amostras resistentes aos antivirais e/ou amostras com potencial pandêmico.

Assim, a articulação, a interação e o trabalho coordenado entre as várias instituições que fazem parte da Rede de Vigilância de Influenza do Ministério da Saúde criarão as informações necessárias para um sistema de monitoramento e vigilância de influenza eficiente no Brasil.

Página intencionalmente branca

OBJETIVOS DO GUIA DE VIGILÂNCIA LABORATORIAL

Este guia tem por finalidade padronizar o diagnóstico laboratorial e fluxo de amostras de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde.

2.1 OBJETIVO GERAL

Fortalecer o diagnóstico laboratorial e a vigilância virológica por meio de métodos padronizados para a coleta, a detecção, o isolamento e a caracterização dos vírus influenza.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a coleta, o transporte e o processamento das amostras clínicas.
- Padronizar os protocolos dos ensaios de imunofluorescência, extração de ácidos nucleicos e RT-PCR em tempo real.
- Assegurar a análise e a interpretação correta dos resultados.

Página intencionalmente branca

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

3.1 PLANEJAMENTO E REVISÃO CÍCLICA DAS ATIVIDADES LABORATORIAIS

RECURSOS HUMANOS

A equipe técnica, responsável diretamente pelos procedimentos de análises (diagnóstico), deverá participar de reunião, oficina ou treinamento, pelo menos uma vez ao ano, para atualização, independente do método diagnóstico (IF ou RT-PCR em Tempo Real) utilizado em sua unidade laboratorial. Essa mesma equipe será responsável por realizar as revisões e as alterações nos Procedimentos Operacionais Padrão (POP) de suas unidades laboratoriais, referentes ao diagnóstico de influenza e outros vírus respiratórios.

Os laboratórios que realizarem diagnóstico por RT-PCR em Tempo Real deverão participar da Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) disponibilizada pelo Laboratório de Referência Nacional, pelo menos uma vez ao ano, preferencialmente antes do período de sazonalidade.

EQUIPAMENTOS E REAGENTES

A manutenção preventiva dos equipamentos e instrumentos deve ser planejada com antecedência e executada de maneira a não impactar na rotina laboratorial e minimizar a necessidade de manutenção corretiva.

Com relação aos insumos utilizados nos processos diagnósticos, é necessário atentar para a maneira correta de armazenamento e utilização, observando as temperaturas de armazenamento, prazos de validade e estabilidade do produto depois de abertos.

Dentro da rede laboratorial para vigilância de influenza, a Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB) é responsável pelo processo de aquisição, armazenamento e distribuição de equipamentos e dos reagentes e insumos para diagnóstico sorológico ou molecular de influenza.

3.2 BOAS PRÁTICAS LABORATORIAIS E BIOSSEGURANÇA

Os agentes infecciosos possuem risco potencial de contaminação do ambiente ou do indivíduo que realiza o processamento da amostra. De acordo com esse risco, cada agente é classificado em uma classe de risco biológico. Existem quatro classes de risco, sendo necessários níveis de contenção diferentes para a manipulação dos agentes de cada classe. Esses níveis de contenção são denominados de níveis de biossegurança (NB1, NB2, NB3 e NB4) e são designados em ordem crescente no maior grau de complexidade de equipamentos de proteção individual (EPI) e de proteção coletiva (EPC), barreiras primárias e secundárias, e procedimentos requeridos para o trabalho com os agentes de cada classe de risco biológico.

O trabalho com agentes infecciosos exige a utilização de práticas seguras de laboratórios, equipamentos de biocontenção apropriados, instalações bem projetadas e controles laboratoriais e administrativos que visam minimizar ou eliminar os riscos de infecção ou lesão acidental do pessoal do laboratório. A avaliação de risco para o manuseio de um agente infeccioso específico determinará a combinação dessas práticas. Com relação ao vírus influenza, de acordo com o subtipo, áreas de biocontenção diferentes são exigidas para que o trabalho em laboratório seja realizado.

Com o intuito de minimizar exposição ocupacional ao vírus influenza, práticas seguras de laboratório são requeridas, assim como instalações laboratoriais apropriadas ao nível de biossegurança requerido para o subtipo viral:

- As atividades de diagnóstico laboratorial de amostras com suspeitas de vírus influenza humanos sazonais (ex.: H1, H3 e B) deverão ser realizadas em área de biocontenção nível 2. Todas as práticas e procedimentos laboratoriais devem ser realizados com base nos requerimentos mínimos para a manipulação de amostras de NB2.
- No caso de amostras com suspeita de vírus influenza zoonótico de alta patogenicidade, como influenza aviária H5N1, H7N9 etc., a manipulação da amostra suspeita deve ser realizada em laboratório NB3. Deste modo, todo o material com suspeita de influenza exótica deve ser encaminhado para o Laboratório de Referência Nacional na Fiocruz que possui estrutura para processamento

e diagnóstico dessas amostras (O Instituto Evandro Chagas também possui estrutura para o processamento de tais amostras).

3.3 COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS CLÍNICAS

O sucesso do diagnóstico depende fundamentalmente da qualidade do espécime clínico coletado, do seu adequado transporte e das condições de armazenamento antes do processamento no laboratório. A sensibilidade do método também é influenciada pela especificidade dos reagentes utilizados e pela experiência técnica do profissional responsável pelo exame. As amostras clínicas requeridas para o diagnóstico de infecções viral no trato respiratório superior são em ordem de preferência: aspirado de nasofaringe (ANF) ou *swabs* combinado (nasal/oral), obtido até sete dias do início do aparecimento dos sintomas (fase aguda da doença). Seja qual for a natureza do espécime, a sua obtenção deve ser realizada observando-se as seguintes medidas de biossegurança: uso de gorro, máscara, óculos, luvas e jaleco.

Os vírus influenza replicam principalmente nas células do epitélio do trato respiratório. A principal via de transmissão são as secreções respiratórias transportadas pelo ar. A coleta de amostras do trato respiratório para o diagnóstico do vírus influenza deve procurar maximizar a coleta de células epiteliais infectadas pelo vírus. Aspirados de Nasofaringes

(ANF) têm um maior teor celular e são superiores aos *swabs* de Nasofaringe (SNF) no que concerne ao isolamento do vírus influenza. Os *swabs* e as lavagens de garganta são de uso limitado no diagnóstico de influenza, uma vez que a maior parte das células capturadas por meio desta técnica é do epitélio escamoso. Os ANF, os SNF e as lavagens são aceitos para a cultura, imunofluorescência e detecção de antígeno viral.

NOTA: Amostras de sangue ou soro não podem ser utilizadas com segurança para diagnóstico de infecção por vírus influenza, não sendo preconizada pelo Ministério da Saúde a sua utilização.

EQUIPAMENTOS

- Bomba de aspiração portátil ou vácuo hospitalar.
- Centrífuga refrigerada.
- Geladeira.
- Freezer -20°C.
- Freezer -70°C.
- Agitador tipo vortex.

MATERIAIS E REAGENTES

- Coletores plásticos descartáveis de secreções com volume de 20 ml, acoplado a sonda uretral n° 6 ½ e controle de vácuo ARGYLE ou Equipo de soro para administração parenteral com sonda plástica uretral n° 6 estéril.
- *Swabs* (15 cm) descartáveis com haste flexível e extremidade em poliéster, estéreis, acondicionados individualmente para coleta de espécimes clínicos. Não deverão ser utilizados *swabs* com haste de madeira e/ou com alginato de cálcio.
- Tubos cônicos descartáveis de polipropileno transparentes, volume de 15 ml, com tampa de rosca, estéreis.
- Caixa isotérmica para transporte do material coletado.
- EPIs, como luvas, máscaras e aventais descartáveis.
- Meio de transporte viral.
- Caneta permanente.
- Gelo reciclável.

PROCEDIMENTO

SOLUÇÃO DE MEIO DE MANUTENÇÃO E TRANSPORTE PARA ESPÉCIMES CLÍNICOS

Solução fisiológica salina (NaCl 0,85%)

1. Preparar uma solução estoque 20x dissolvendo 170 g de NaCl em água destilada deionizada para um volume final de 1 litro.
2. Esterilizar por autoclavação.
3. Para preparar a solução salina 0,85% para uso, adicionar 50 ml da solução estoque 20x a 950 ml de água destilada deionizada.
4. Esterilizar por autoclavação.
5. Armazenar solução fisiológica salina a 4°C por até 3 semanas.

Solução de lavagem da amostra respiratória para investigação

Solução fisiológica salina, solução de *Hanks* ou meio de cultura celular sem antibióticos e proteínas podem ser utilizados como solução de lavagem.

Meio de Transporte Viral (MTV)

1. Solução de *Hanks*, meio de cultivo de células ou caldo triptose fosfato suplementado com proteína, para estabilização viral, tais como soro albumina bovina fração V, gelatina a uma concentração final de 0,5-1%. A adição

antibiótico (1.600 U/mL de penicilina e 800 µg/mL de estreptomicina) e antifúngicos (10 µg/mL de fungizona) é recomendada para evitar a proliferação de bactérias e fungos.

2. Na falta de meio de transporte adequado PBS pH 7.2 pode ser excepcionalmente utilizado acrescido de proteína, antibióticos e antifúngicos.

INDICAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRAS

Síndrome Gripal

A coleta deve ser realizada nas unidades sentinelas mediante o cumprimento da definição de caso, oportunidade de coleta (preferencialmente entre o 3º e 7º dia após o início dos primeiros sintomas) a meta é coletar amostras de cinco casos de SG por semana epidemiológica em cada unidade sentinela de SG.

Síndrome Respiratória Aguda Grave

A coleta deve ser realizada independente do dia de início dos sintomas em todos os casos de SRAG hospitalizados e óbitos, incluindo os casos em unidade de terapia intensiva (UTI) em unidades de saúde sentinelas da influenza.

Surto de Síndrome Gripal

Devem ser coletadas amostras clínicas de no máximo três casos de SG que estiverem preferencialmente entre o 3º e 7º dia após o início dos primeiros sintomas. Sugere-se que a coleta seja feita em casos situados em distintos pontos

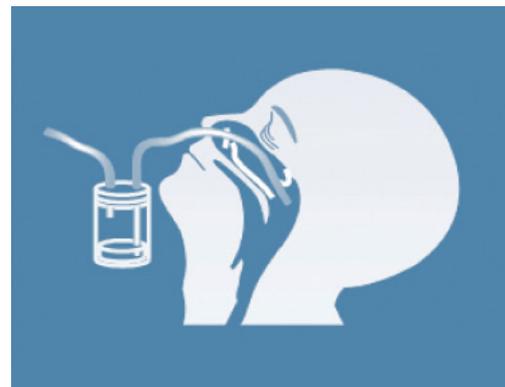
da mesma cadeia de transmissão. Em situações de surto, as coletas de amostras clínicas devem ser realizadas na unidade de saúde mais próxima ou dentro do próprio ambiente de ocorrência do surto, caso haja condições de minimizar a transmissão do agente infeccioso durante o procedimento.

COLETA DE ASPIRADO DE NASOFARINGE (ANF)

- Com o coletor próprio, aspirar a secreção de nasofaringe das duas narinas. Pode também ser utilizado como coletor um equipo de solução fisiológica, acoplado a uma sonda uretral número 6. A aspiração deve ser realizada com bomba aspiradora portátil ou vácuo de parede; não utilizar pressão de vácuo muito forte.
- Durante a coleta, a sonda é inserida através da narina até atingir a região da nasofaringe, quando então o vácuo é aplicado, aspirando a secreção para o interior do coletor ou equipo (Figura 3). Este procedimento deve ser realizado em ambas as narinas, mantendo movimentação da sonda para evitar que haja pressão diretamente sobre a mucosa, provocando sangramento. Alternar a coleta nas duas fossas nasais até obter um volume de aproximadamente 1 mL de secreção. Pacientes febris apresentam secreção espessa. Após nebulização com soro fisiológico a secreção fica mais fluida, abundante e consequentemente mais fácil de ser obtida. Não insistir se a coleta não alcançar o volume desejado (~ 1mL), pois poderá ocasionar lesão de mucosa.

FIGURA 3

Ilustração da técnica para a coleta de aspirado nasofaríngeo



Fonte: BRASIL, 2014.

- Após aspirar a secreção nasofaríngea com o coletor próprio, inserir a sonda de aspiração no frasco, contendo 3 mL de meio de transporte viral. Aspirar todo o meio para dentro do coletor. Retirar a tampa com as sondas e desprezar como resíduo biológico. Fechar o frasco coletor utilizando a tampa plástica que se encontra na parte inferior do coletor. Vedar esta tampa com plástico aderente tipo Parafilm e manter refrigerado a 4°C (não congelar). Não havendo disponibilidade de Parafilm, vedar o frasco com esparadrapo.

- Caso a amostra seja coletada com equipo, não deve ser adicionado o meio de transporte viral. O equipo deve ser colocado em saco plástico, lacrado e identificado. Manter refrigerado a 4°C (não congelar).
- As amostras deverão ser encaminhadas ao laboratório, individualizadas em saco plástico, lacrado e identificado adequadamente:
 - a) nome do paciente,
 - b) natureza do espécime,
 - c) data de coleta,
 - d) cópia da ficha de investigação epidemiológica.

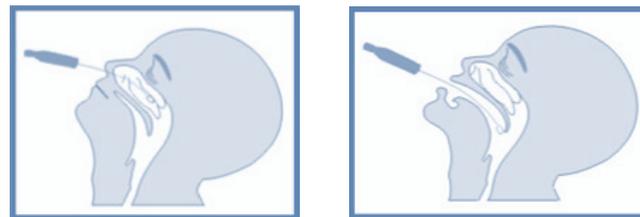
O transporte do espécime ao laboratório deverá ser realizado no mesmo dia da coleta, em caixa de isopor com gelo e/ou caixa isotérmica para transporte de material. Excepcionalmente, o aspirado poderá ser estocado e preservado, refrigerado a 4°C, por período não superior a 24 h.

COLETA DE SWABS DE NASOFARINGE (SNF) E OROFARINGE (SOF)

- Na impossibilidade de utilizar a técnica de ANF, como alternativa, poderá ser utilizada a técnica de SNF e SOF, exclusivamente com *swab* de Rayon.
- Deverão ser coletados três *swabs*, um *swab* de orofaringe e dois *swabs* de nasofaringe, sendo um de cada narina.

- **Swab de nasofaringe** – A coleta deve ser realizada com a fricção do *swab* na região posterior do meato nasal tentando obter um pouco das células da mucosa (Figura 4A). Coletar *swab* nas duas narinas (um *swab* para cada narina).
- **Swab de orofaringe** – Colher *swab* na área posterior da faringe e tonsilas, evitando tocar na língua (Figura 4B).

FIGURA 4
técnica para a coleta de *swab* combinado



A – *Swab* nasal.

B – *Swab* oral.

Fonte: BRASIL, 2014.

- Após a coleta, inserir os três *swabs* em um mesmo tubo de polipropileno (dar preferência para utilização de frasco plástico tentando evitar a ação da RNase) contendo 3 mL de meio de transporte viral. Lacrar e identificar adequadamente o frasco. Manter refrigerado a 4°C. Excepcionalmente, estes poderão ser estocados e preservados a 4°C, por período não superior a 72 h.

OBS.:

- Os swabs a serem usados devem ser estéreis e possuir haste de plástico, do tipo Rayon.
 - Não deverão ser usados swabs com haste de madeira e/ou com alginato de cálcio, pois os mesmos interferem nas reações utilizadas para diagnóstico molecular e isolamento de vírus.
-

ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIME CLÍNICO

- As amostras não poderão ser congeladas.
- As amostras de secreção respiratória devem ser mantidas em temperatura adequada de refrigeração (4°C a 8°C) e encaminhadas aos Lacens, preferencialmente no mesmo dia da coleta (no caso do Lacen realizar a imunofluorescência IF).

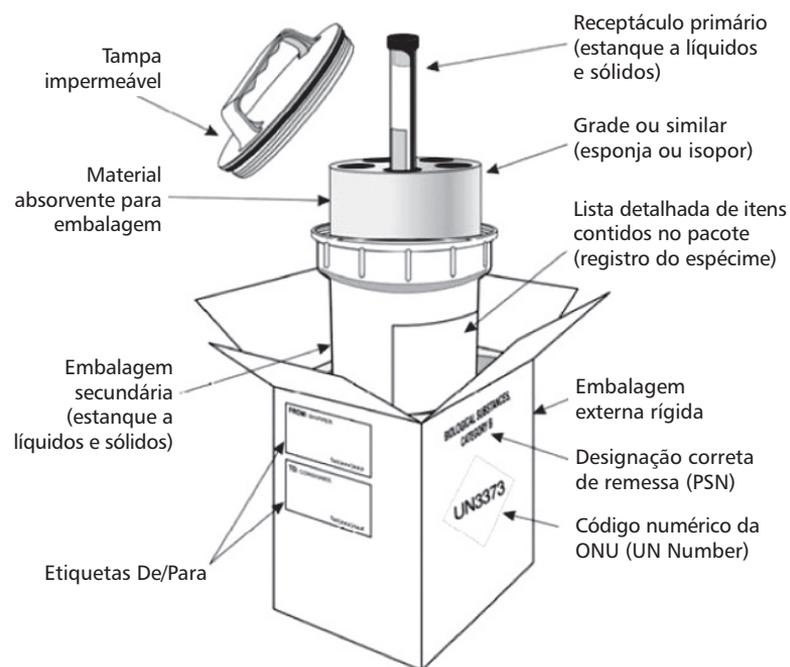
TRANSPORTE DE ESPÉCIME CLÍNICO

- As condições de transporte devem ser otimizadas para garantir uma máxima recuperação dos espécimes.
- O meio de transporte viral (MTV) utilizado é determinante para a garantia de uma boa recuperação dos vírus. Sugere-se que o MTV inclua uma solução salina balanceada com pH neutro e estabilizadores de proteína, como a gelatina ou a albumina sérica bovina (ASB), e antibiótico para reduzir/inibir o crescimento de organismos comensais e bactérias.

- O uso de soro fetal bovino em MTV para o transporte de espécimes deve ser evitado, pois ele poderá interferir no processo de isolamento do vírus influenza.
- Entre os meios apropriados, podem ser citados a Solução Salina Equilibrada de Hank (*Hank's Balanced Salt Solution*) e Meio Mínimo Essencial de Earle (*Earle's Minimal Essential Medium*) com ágar de infusão de vitela, gelatina ou ASB.
- Todas as unidades coletoras (unidades de saúde) deverão encaminhar as amostras ao Lacen de seu estado ou Distrito Federal acompanhadas da ficha epidemiológica devidamente preenchida. As amostras deverão ser colocadas em caixas (térmicas) de paredes rígidas, que mantenham a temperatura adequada de refrigeração (4°C a 8°C) até a chegada ao Lacen.
- Para o transporte de amostra ao laboratório de referência, o Lacen deverá acondicionar a amostra em caixas específicas para Transporte de Substâncias Infeciosas, preferencialmente em gelo seco. Na impossibilidade de obter gelo seco, a amostra poderá ser congelada a -70°C e encaminhada em gelo reciclável. O envio e a comunicação com a informação do "número de conhecimento aéreo" devem ser imediatos para o respectivo laboratório de referência. O transporte deve obedecer as Normas da Associação Internacional de Transporte Aéreo (IATA).
- As embalagens (IATA UN3373) para transporte são fornecidas pela CGLAB (Figura 5). A CGLAB também é responsável por coordenar o transporte das amostras.

FIGURA 5

Ilustração da embalagem tripla para transporte de substâncias infecciosas da IATA – UN3373



Fonte: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 2009.

3.4 COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS *POST-MORTEM*

Este procedimento deve ser realizado apenas em locais onde é viável a realização de técnicas de coleta de amostra *post-mortem*. Adicionalmente, este procedimento deve ser realizado apenas em casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave sem diagnóstico etiológico prévio, em situações especiais, indicadas pela Vigilância Epidemiológica:

- Indivíduos com idade entre 2 e 60 anos.
- Pacientes em uso de oseltamivir com internação prolongada (> 10 dias).

Assim como para material clínico, o sucesso do diagnóstico de uma amostra coletada após óbito depende fundamentalmente da qualidade do espécime clínico coletado. A coleta de amostra clínica deve ser sempre priorizada, deixando a coleta de material *post-mortem* para casos em que a coleta clínica não foi possível ser realizada antes do óbito. Alterações celulares e químicas *post-mortem* iniciam no organismo imediatamente ou pouco tempo após o óbito e progridem até a desintegração do corpo. Assim, o tempo entre o óbito e a coleta da amostra deve ser o menor possível, devendo não ultrapassar 12 horas.

Os vírus da influenza humana replicam principalmente nas células do epitélio do trato respiratório. A principal via de transmissão são as secreções respiratórias transportadas pelo ar. Os ácidos nucleicos virais podem ser detectados em

diversos tecidos das vias aéreas respiratórias, principalmente de brônquios e pulmões. Uma coleta de tecido apropriada garante melhor chance de diagnóstico molecular. No entanto, considerando a principal infecção secundária à influenza, foram contempladas, neste item, orientações para coleta de amostras para o diagnóstico bacteriano diferencial, bem como para o diagnóstico histopatológico.

COLETA DOS ESPÉCIMES TECIDUAIS

Devem ser coletados fragmentos de tecido, de cada ponto anatômico de coleta de amostrado listado a seguir, com dimensões aproximadas de 1 a 3 cm. Amostras de outros sítios das vias aéreas também podem ser submetidas a ensaios imuno-histoquímicos e moleculares. As amostras coletadas de órgãos diferentes deverão ser colocadas em recipientes separados e devidamente identificados.

PONTOS ANATÔMICOS DE COLETA DE AMOSTRAS

- Região central dos brônquios (hilar), dos brônquios direito e esquerdo e da traqueia proximal e distal.
- Parênquima pulmonar direito e esquerdo.
- Tonsilas e mucosa nasal.
- Espécimes de qualquer outro órgão, mostrando aparente alteração macroscópica, também podem ser encaminhados para investigação de etiologia viral.

- De pacientes com suspeita de miocardites, encefalites e rbdomiolise podem ser coletados fragmentos do miocárdio (ventrículo direito e esquerdo), SNC (córtex cerebral, gânglios basais, ponte, medula e cerebelo) e musculoesquelético, respectivamente.

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE TECIDO

PARA DIAGNÓSTICO VIRAL

- As amostras frescas, coletadas de diferentes sítios das vias respiratórias ou de qualquer outra localização anatômica, devem ser acondicionadas individualmente, em recipientes estéreis e imersas em meio de transporte viral ou solução salina tamponada (PBS pH 7.2), suplementadas com antibióticos.
- Imediatamente após a coleta, os espécimes identificados com sua origem tecidual devem ser congelados e transportados em gelo seco.

PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL BACTERIANO

- As amostras frescas, coletadas de diferentes sítios das vias respiratórias ou de qualquer outra localização anatômica, devem ser acondicionadas individualmente, em recipientes estéreis e imersas em solução salina tamponada (PBS pH 7.2), sem antibióticos.
- Imediatamente após a coleta, os espécimes identificados com sua origem tecidual devem ser mantidos e transportados sob refrigeração (4°C) ao laboratório para diagnóstico.

PARA DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

- A coleta de amostras para realização do diagnóstico histopatológico deve ser feita, observando-se os protocolos em vigência, nos serviços locais de patologia.
- Acondicionar as amostras em frasco de vidro com boca larga com formalina tamponada a 10%.
- Utilizar parafina sem compostos adicionais (por exemplo: cera de abelha, cera de carnaúba etc.) no processo de parafinização dos fragmentos.

ATENÇÃO: Caso o paciente não tenha amostra de secreção respiratória (*swab* nasal e faríngeo ou aspirado de nasofaringe) colhida previamente, é necessário colher também. Entretanto, a coleta de amostra de secreção respiratória não substitui a coleta de material de tecido pulmonar.

TRANSPORTE DAS AMOSTRAS DE TECIDO

- As condições de transporte devem ser otimizadas para garantir máxima recuperação dos espécimes.
- Com a amostra de tecido, enviar: resumo do histórico clínico, cópia do laudo preliminar ou conclusivo da necropsia, cópia de qualquer resultado laboratorial pertinente, ficha completa de identificação do indivíduo.

- Para efetuar o transporte das amostras biológicas devem-se obedecer rigorosamente as normas de biossegurança vigentes, segundo as normas de acondicionamento e transporte de substâncias infecciosas da lata (Figura 5).
- As embalagens para transporte são fornecidas pela CGLAB, que também é responsável por coordenar o transporte das amostras.

3.5 PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS CLÍNICAS

LACENS

Ao receber as amostras clínicas, o laboratório responsável do Lacen, deverá separar três alíquotas distintas, sendo uma para o diagnóstico laboratorial a ser realizado no Lacen as duas restantes para envio ao Laboratório de Referência. As alíquotas que serão enviadas ao laboratório de referência, deverão ser armazenadas congeladas, preferencialmente a -70°C até seu envio, em gelo seco, que ocorre a cada 15 dias sob a coordenação da CGLAB.

O Lacen processará as análises na mesma semana epidemiológica do recebimento da amostra, uma vez que o prazo de liberação de resultados é de no máximo sete dias.

Para os laboratórios que realizam Imunofluorescência (IF) as amostras não deverão ser congeladas, uma vez que esse procedimento inviabiliza o diagnóstico.

As amostras deverão ser encaminhadas aos laboratórios de referência de acordo com os critérios a seguir descritos:

LACEN QUE REALIZAM SOMENTE IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF)

- 100% das amostras positivas.
- 100% das amostras inconclusivas na Imunofluorescência (IF).
- Amostras de casos de surtos.
- 10% das amostras negativas.

LACEN QUE REALIZAM RT-PCR EM TEMPO REAL

O quantitativo de amostras positivas a serem enviadas aos laboratórios de referência varia de acordo com o mês vigente e encontra-se descrito por estado na Tabela 2.

OBS.: Os fluxos e períodos de amostras enviadas aos laboratórios de referência podem ser eventualmente alterados e modificados conforme as necessidades e sazonalidade da influenza. Qualquer alteração será comunicada aos respectivos responsáveis nos laboratórios.

TABELA 2

Quantitativo de amostras positivas para influenza para encaminhamento aos laboratórios de referência de acordo com o mês

REGIÃO	UF	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	TOTAL
Norte	Acre	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	5	100
	Amazonas	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	5	100
	Amapá	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	5	100
	Pará	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	5	100
	Rondônia	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	5	100
	Roraima	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	5	100
	Tocantins	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	5	100
Nordeste	Ceará	5	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	100
	Maranhão	5	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	100
	Paraíba	5	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	100
	Pernambuco	5	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	100
	Piauí	5	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	100
	Rio Grande do Norte	5	15	10	10	10	10	15	5	5	5	5	5	100
	Alagoas	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	Bahia	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	Sergipe	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
Centro-Oeste	Distrito Federal	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	Goiás	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	Mato Grosso	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	Mato Grosso do Sul	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
Sudeste	Espírito Santo	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	Minas Gerais	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	Rio de Janeiro	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	São Paulo	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
Sul	Paraná	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	Rio Grande do Sul	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100
	Santa Catarina	5	5	5	5	15	10	10	10	10	15	5	5	100

Fonte: Ministério da Saúde.

Para a seleção destas amostras, devem-se utilizar os seguintes critérios:

- Amostras positivas com Ct \leq 30.
- Incluir amostras de diferentes tipos/subtipos (A/H1, A/H3 e B).
- Incluir amostras de diferentes faixas etárias.
- Incluir amostras tanto de SG quanto de SRAG.
- Incluir amostras das diferentes regiões de abrangência.
- Incluir amostras de casos de surtos.
- As amostras de SRAG devem obedecer ao seguinte critério:
 - ▶ Indivíduos com idade entre 5 anos e < de 60 anos.
 - ▶ Pacientes em uso de oseltamivir com internação prolongada (> 10 dias).

ALÉM DESTAS AMOSTRAS, TODOS OS LACENS TAMBÉM DEVERÃO ENVIAR AOS LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA

- Todas as amostras não subtipáveis.
- Todas as amostras inconclusivas.
- Todas as amostras de trabalhadores de avicultura e suinocultura.
- Todas as amostras de óbitos: indivíduos com idade entre 5 anos e < de 60 anos, vacinados recentemente ou em uso de oseltamivir até dois dias depois do início dos sintomas.

OBS.: Qualquer alteração destas informações será comunicada aos respectivos responsáveis nos laboratórios.

LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA NACIONAL E REGIONAL

Os Laboratórios de Referência são responsáveis por realizar os diagnósticos moleculares de identificação do vírus respiratório, assim como tipo e subtipo de influenza, para os Lacens que realizam somente Imunofluorescência (IF).

Os laboratórios de referência também são responsáveis pelas análises posteriores à identificação viral, tais como isolamento, caracterizações antigênicas e genômicas, análise filogenéticas e investigação de resistência aos antivirais.

Os Laboratórios de Referência enviam um quantitativo de isolados virais representativo dos vírus circulantes nos estados brasileiros para o Centro Colaborador da OMS no CDC para análises antigênicas avançadas, cujos resultados são parte dos dados utilizados para as recomendações da composição anual da vacina contra influenza.

PROCESSAMENTO

CONDIÇÕES GERAIS

Antes do processamento, avaliar se o espécime foi adequadamente coletado e transportado para evitar a geração de falsos resultados. Evitar a formação de aerossóis. Notificar a Unidade Sentinela no eventual recebimento de amostras inadequadas. Considerando a possibilidade da manipulação de um vírus exótico ou emergente, a amostra deve ser encaminhada ao Laboratório de Referência Nacional na Fiocruz.

EQUIPAMENTOS

- Centrífuga refrigerada.
- Pipetadores automáticos (P100, P200, P1.000).
- Freezer -20 °C.
- Freezer -70 °C.
- Agitador tipo “Vortex”.
- Cabine de Segurança Biológica Classe II.
- Geladeira a 4°C.

MATERIAL/REAGENTES

- Tubos cônicos descartáveis de polipropileno transparentes, volume de 15 mL, com tampa de rosca, estéril.
- Criotubos devidamente identificados com o número da amostra e o ano, VR ou PCR, dependendo do ensaio que deverá ser realizado.
- Caixa isotérmica para transporte do material coletado.
- Caneta permanente.
- Recipiente para gelo.
- Micropipetadores automáticos (P100, P200).
- Pipetas Pasteur estéreis.
- Ponteiras descartáveis de 50 a 200 μ L.
- EPIs como luvas, máscaras, óculos, aventais descartáveis e touca.

- Cubas para descarte de materiais contaminados.
- Gaze.
- Solução de Hipoclorito de Sódio 10%, para descontaminação.
- Lâminas de vidro para microscopia de imunofluorescência (26 mm x 76 mm) extrafina, lapidada e com uma extremidade fosca.
- Solução salina tamponada (PBS) pH = 7.2.
- Acetona PA (C₃H₆O), refrigerada.

PROCEDIMENTO

A partir do aspirado de nasofaringe

1. Com uma pipeta de transferência descartável ou “Pasteur”, transferir o conteúdo do ANF mais meio de transporte do coletor ou equipo para um tubo cônico (17 x 119 mm), previamente identificado.
2. Realizar pipetagens sucessivas para homogeneizar a secreção respiratória com vistas a liberar as células epiteliais do muco.
3. Centrifugar a 1.000 rpm por 10 minutos.
4. Transferir o sobrenadante para um tubo (criotubo), previamente identificado, e estocar em garrafa de nitrogênio líquido ou freezer -70°C para posterior tentativa de cultivo do vírus.

5. Ressuspender o sedimento celular em 3 a 5 mL de PBS, homogenizar e centrifugar novamente a 1.000 rpm por 5 a 10 minutos.
6. Desprezar o sobrenadante e repetir o procedimento no caso de secreções muito turvas e espessas. Obtendo-se suspensão de aspecto límpido centrifugar novamente a 1.000 rpm por 5 a 10 minutos.
7. Desprezar o sobrenadante.
8. Ressuspender o sedimento celular em PBS no volume de aproximadamente (50 a 100 μ L) na dependência da quantidade de células obtidas, para obtenção de suspensão opalescente.
9. Limpar a lâmina com acetona e identificá-la com o nome ou número de registro do paciente.
10. Adicionar uma gota (25 μ L) da suspensão celular nas áreas (círculos) previamente definidas da lâmina. Preparar duas ou mais lâminas adicionais de cada espécime clínico para análises complementares.
11. Secar a lâmina na Cabine de Segurança Biológica em funcionamento.
12. Imergir a lâmina por 10 minutos em acetona gelada, (no mínimo 4°C) para fixar a preparação.
13. Após a fixação e secagem à temperatura ambiente, a lâmina pode ser conservada na geladeira (4°C) por até 72 horas antes de seu processamento em teste de IFI.

OBS.: Alternativamente, as lâminas podem ser estocadas a -20°C por vários meses ou em *freezer* -70°C ao abrigo da luz por período superior a um ano.

A partir do *swabs* oral/nasal combinados

1. Agitar o tubo contendo os *swabs* em um agitador tipo “vortex”.
2. Com movimentos rotatórios pressionar o *swabs* na parede do tubo para escorrer o fluido nele retido.
3. Desprezar os *swabs* e centrifugar a suspensão por 10 minutos a 1.000 rpm.
4. Transferir o sobrenadante para um tubo (criotubo), previamente identificado, e estocar em garrafa de nitrogênio líquido ou freezer -70°C para posterior tentativa de cultivo do vírus.
5. Ressuspender o sedimento celular em 3 a 5 mL de PBS e centrifugar novamente a 1.000 rpm por 5 a 10 minutos.
6. Desprezar o sobrenadante e novamente ressuspender o sedimento celular em PBS. Dependendo da quantidade de células obtidas, adicionar um volume de PBS (aproximadamente 3 mL) para obtenção de suspensão opalescente.
7. Limpar a lâmina com acetona e identificá-la com o nome ou número de registro do paciente.

8. Adicionar uma gota (25 μ L) da suspensão celular nas áreas (círculos) previamente definidas da lâmina. Preparar duas ou mais lâminas adicionais de cada espécime clínico para análises complementares.
9. Secar a lâmina na Cabine de Segurança Biológica em funcionamento.
10. Imergir a lâmina por 10 minutos em acetona gelada, (no mínimo 4°C) para fixar a preparação.
11. Após a fixação e secagem à temperatura ambiente, a lâmina pode ser conservada na geladeira (4°C) por até 72 horas antes de seu processamento em teste de IFI.

OBS.: Alternativamente, as lâminas podem ser estocadas a -20°C por vários meses ou em *freezer* -70°C ao abrigo da luz por período superior a um ano.

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIO

Este protocolo estabelece o teste de imunofluorescência indireta utilizando-se o painel de anticorpos monoclonais para a pesquisa e identificação dos vírus respiratórios influenza A e B, parainfluenza tipo 1,2 e 3, vírus sincicial respiratório e adenovírus. *Kit* comercial da Biotrin- mais células de descamação do epitélio respiratório do paciente apresentando quadro de SG ou SRAG (diagnóstico rápido) ou para identificação de vírus respiratórios isolados em culturas

de células, cuja replicação é revelada pelo efeito citopático característico desse vírus.

Este ensaio é utilizado na identificação rápida e específica de antígenos virais em células infectadas. A técnica de imunofluorescência indireta está baseada na reação imunológica onde participam os antígenos e os anticorpos monoclonais específicos produzidos em camundongos. O conjugado, anticorpo anti IgG de camundongo marcado com a fluoresceína, se liga ao anticorpo monoclonal que reagiu com o antígeno correspondente o resultado e pode ser observado em um microscópio de imunofluorescência com luz ultravioleta (UV) ou halogênio, que ativa o cromógeno e permite sua visualização.

O grande valor deste teste é a rápida identificação dos vírus respiratórios quando são utilizados anticorpos específicos (fornecidos pelo *KIT*). As lâminas que derem resultados inconclusivos devem ser repetidas. É importante, também, o laboratório manter lâminas estocadas a -70°C para o controle de qualidade dos reagentes, procedimentos utilizados e para ensaios confirmatórios.

Para evitar a perda de células epiteliais respiratórias por lise, amostras devem ser resfriadas logo após a coleta e processadas em até 1 a 2 horas. As células são lavadas com o intuito de remover muco contaminante e então o material é distribuído em círculos, em lâminas de microscopia, secas, fixas, coradas e examinadas para a visualização do complexo de interação antígeno-anticorpo em microscópio de fluorescência.

A sensibilidade desse método é altamente influenciada pela qualidade da amostra, a especificidade do reagente utilizado e o nível de experiência do profissional na leitura e interpretação do teste. Caso seja possível, mais de uma lâmina deve ser preparada para cada amostra no caso de ser necessário repetir a IFI.

CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

- Para a realização do ensaio, o usuário deve utilizar jaleco, luvas, máscara e touca.
- As lâminas devem ser descartadas em local apropriado para perfurocortante contaminado (Descarpack).
- Caso entre em contato com azida sódica (presente no conjugado, nos anticorpos monoclonais e fluido de montagem) lavar a área afetada abundantemente em água corrente.
- Evitar contato com azul de Evans (presente no conjugado anti-IgG de camundongo) por ser carcinogênico. Caso haja contato com a pele, lavar abundantemente em água corrente.
- A acetona deve ser manipulada tomando-se os devidos cuidados e em lugar com ventilação adequada, pois é extremamente inflamável e nocivo se inalado.

EQUIPAMENTOS

- Microscópio de fluorescência.
- Estufa a 37°C.
- Geladeira.
- Centrífuga.
- Pipeta 1 mL.

MATERIAL/REAGENTES

- Lâmina de microscopia com 12 círculos.
- Lamínulas.
- PBS pH 7.2.
- Água destilada.
- Fluido de montagem (fornecido pelo *kit*) ou solução glicerina 90% em PBS.
- Anticorpo monoclonal contra: VSR, Adeno, Flu A e B e PF 1, 2 e 3, fornecido pelo *kit*.
- Conjugado anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína, fornecido pelo *kit*.
- Pool de anticorpos monoclonais, fornecido pelo *kit*.
- Controle negativo (Soro Normal), fornecido pelo *kit*.
- Câmara úmida.
- Porta lâminas para lavagens das lâminas.

- Tubos descartáveis de polipropileno transparentes, volume de 15 mL, com tampas de rosca.
- Lâminas com antígenos – controle positivo para VSR, adenovírus, influenza A e B e parainfluenza 1, 2 e 3.

PROCEDIMENTO

O teste é realizado segundo as instruções do *kit* comercial *Respiratory Panel Viral Screening and Identification Kit*. É importante sempre utilizar lâminas de controle positivo e de controle negativo quando realizar o ensaio.

PREPARO DAS LÂMINAS A PARTIR DE CULTURA CELULAR

1. Raspar a camada celular, apresentando efeito citopático característico de um determinado vírus, utilizando um raspador de células.
2. Transferir a suspensão de células (camada raspada e meio de cultura celular) para tubos descartáveis de polipropileno transparentes, volume de 15 mL, com tampa de rosca, estéreis.
3. Acrescentar 10 mL de PBS pH 7,2 e homogeneizar bem.
4. Centrifugar a 1.000 rpm por 10 minutos.
5. Desprezar o sobrenadante, acrescentar 10 ml de PBS pH 7,2 ao sedimento e homogeneizar.
6. Centrifugar a 1.000 rpm por 10 minutos e desprezar o sobrenadante.
7. Acrescentar 50 a 100 μ L de PBS pH 7,2 ao sedimento, homogeneizar e preparar as lâminas (para cada 1 mL de suspensão de células infectadas é preparada 1 lâmina com 2 orifícios).
8. Fixar em acetona gelada (5 minutos a 4°C).

ENSAIO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

1. Remover o *kit* de diagnóstico da geladeira e deixar à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos antes da sua utilização.
2. Retirar a lâmina contendo a suspensão celular fixada da geladeira ou *freezer* e deixar a temperatura ambiente.
3. Colocar a lâmina em uma câmara úmida (caixa plástica tendo o fundo revestido com papel toalha umedecido).
4. Adicionar uma gota (25 μ L) dos diferentes anticorpos monoclonais (*screening*, adenovírus, influenza A, influenza B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, vírus respiratório sincicial e normal *mouse antibody*) em distintos círculos da lâmina.
5. Incubar a 37°C por 30 minutos para que ocorra a reação antígeno-anticorpo.
6. Realizar três lavagens por imersão da lâmina em PBS, com duração de 5 minutos cada.
7. Posicionar a lâmina verticalmente, sobre uma folha de papel-toalha, para retirar o excesso de PBS. A partir desta etapa a amostra fixada não poderá ser seca.

8. Adicionar uma gota do conjugado (anti-mouse IgG (isotiocianato de fluoresceína) sobre cada círculo da lâmina.
9. Incubar a lâmina na câmara úmida a 37°C por 30 minutos.
10. Realizar nova série de três lavagens sucessivas em PBS, com duração de 5 minutos cada.
11. Imergir rapidamente a lâmina em água destilada.
12. Posicionar a lâmina verticalmente, sobre uma folha de papel-toalha, para retirar o excesso de água.
13. Adicionar uma gota (10µL) do fluido de montagem sobre o centro de cada spot da lâmina.
14. Posicionar, cuidadosamente, uma lamínula sobre a lâmina evitando a formação de bolhas de ar entre as duas superfícies.
15. Examinar ao microscópio de imunofluorescência com objetiva de 40x e ocular de 10x.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A lâmina deve exibir no mínimo três células por campo para ser adequada à detecção. Um número insuficiente de células pode levar a resultados falso-negativos. A fluorescência é reconhecida como uma coloração verde-maçã intensa sempre localizada no interior da célula. O padrão de coloração é geralmente granular, porém grandes inclusões podem estar homoganeamente coradas. Qualquer coloração extracelular ou fragmentos de células mostrando fluorescência devem

ser considerados como inespecíficos. Três ou mais células por campo intactas mostrando um padrão específico de fluorescência podem ser aceitas como resultado positivo.

QUADRO 1

Interpretação dos resultados

VÍRUS OU GRUPO DE VÍRUS	PADRÃO DE FLUORESCÊNCIA
Influenza	A fluorescência pode estar presente somente no núcleo, no citoplasma ou em ambos.
Parainfluenza	A fluorescência é citoplasmática com aspecto de grânulos finos.
VSR	A fluorescência é inteiramente citoplasmática. Corpúsculos de inclusão e partículas finas fluorescentes podem estar presentes.
Adenovírus	A fluorescência por adenovírus é variável, geralmente consistindo em uma fluorescência nuclear e citoplasmática.

Fonte: DIAGNOSTIC HYBRIDS, ©2011.

O padrão de negatividade é evidenciado pela ausência de fluorescência específica e o predomínio de coloração avermelhada nas células devido à presença do azul de Evans no conjugado.

Sempre que um novo *kit* for aberto, testar as lâminas controles contidas nele, assim, após a leitura das lâminas e a obtenção dos resultados esperados (controle positivo = resultado positivo e controle negativo = resultado

negativo), o *kit* deve ser liberado para ser utilizado na rotina de detecção e identificação de antígenos virais em células infectadas diretamente das secreções de nasofaringe e nas culturas celulares.

LIMITAÇÕES

As células epiteliais infectadas com vírus são extremamente frágeis e, portanto, facilmente danificadas pelo manuseio inadequado ou demora no seu processamento. Também é de extrema importância que amostras clínicas a serem submetidas à técnica de imunofluorescência sejam imediatamente refrigeradas após a coleta e mantidas nesta temperatura até o seu processamento. A centrifugação do espécime não deve ser superior a 1.000 rpm, sob o risco de ocasionar lesão celular. O número de células infectadas que podem ser obtidas por *swab* ou aspirado decresce durante o curso da infecção. Portanto, os espécimes devem ser obtidos preferencialmente entre o 3º e 7º dia após o início dos primeiros sintomas.

3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIO

Este protocolo estabelece o teste de Imunofluorescência Direta (IFD) utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais para a pesquisa e a detecção de vírus respiratórios, são eles: vírus influenza A e B, parainfluenzavírus tipo 1,2 e 3, vírus respiratório sincicial e adenovírus.

Este ensaio é utilizado na identificação rápida e específica de antígenos virais em células infectadas. A técnica de imunofluorescência direta está baseada na reação imunológica onde participam os antígenos e os anticorpos monoclonais específicos produzidos em camundongos e marcados com a fluoresceína, o imunocomplexo correspondente ao resultado pode ser observado em um microscópio de imunofluorescência com luz ultravioleta (UV) ou halogênio, que ativa o cromógeno e permite sua visualização.

A maior vantagem deste teste é a rápida identificação dos vírus respiratórios quando são utilizados anticorpos monoclonais específicos (fornecidos pelo *kit*). Para realização dele devem ser utilizadas lâminas contendo células fixadas, oriundas de espécimes clínicos coletados de pacientes com SG ou SRAG, ou de cultura de células.

A sensibilidade desse ensaio está diretamente ligada à qualidade da amostra, a especificidade do reagente utilizado e ao nível de experiência do profissional na leitura e interpretação do teste. Se possível, mais de uma lâmina deve ser preparada para cada amostra no caso de ser necessário repetir a IFD.

CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

- Para a realização do ensaio, o usuário deve utilizar jaleco, luvas, máscara e touca.
- As lâminas devem ser descartadas em local apropriado para perfurocortante contaminado (Descarpack).
- Caso entre em contato com azida sódica (presente nos anticorpos monoclonais, solução de lavagem 40x e fluido de montagem) lavar a área afetada abundantemente em água corrente.
- Evitar contato com azul de Evans (presente nos anticorpos monoclonais) por ser carcinogênico. Caso haja contato com a pele, lavar abundantemente em água corrente.
- A acetona deve ser manipulada tomando-se os devidos cuidados e em lugar com ventilação adequada, pois é extremamente inflamável e nocivo, se inalado.

EQUIPAMENTOS

- Microscópio de fluorescência.
- Estufa a 37°C.
- Geladeira.

MATERIAL/REAGENTES

- Lâmina de microscopia com 12 círculos e extremidade fosca.
- Lamínulas.

- Água destilada.
- Câmara úmida (caixa plástica forrada com papel-toalha umedecido).
- Porta lâminas para lavagens das lâminas.
- Fluido de montagem (fornecido pelo *kit*) ou solução glicerina 90% em PBS.
- Anticorpo monoclonal contra: VRS, Adeno, Flu A e B e PF 1, 2 e 3, fornecido pelo *kit*.
- *Pool* de anticorpos monoclonais (*Respiratory Virus DFA Screening Reagent*), fornecido pelo *kit*.
- Controle negativo (Soro Normal- *Normal Mouse Gamma Globulin DFA Reagent*), fornecido pelo *kit*.
- Lâminas com antígenos – controle positivo para VSR, adenovírus, influenza A e B e parainfluenza 1, 2 e 3.

PROCEDIMENTO

O teste é realizado segundo as instruções do *kit* comercial *D³ Ultra™ DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit (Diagnostic Hybrids)*. É importante sempre utilizar lâminas de controle positivo e de controle negativo quando realizar o ensaio.

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LAVAGEM 1X

- Após o armazenamento a 2°C a 8°C, alguns sais da solução de lavagem 40x concentrada (*40X Wash Solution Concentrate*) podem formar cristais. Caso isso ocorra,

deixar a solução à temperatura ambiente (20°C a 25°C) para dissolver os cristais, em seguida homogeneizar.

- Adicionar ao conteúdo de 25 ml da solução de lavagem 40x concentrada (*40X Wash Solution Concentrate*) 975 ml de água destilada para se obter a solução de lavagem 1x.
- Rótular a Solução de lavagem 1x com data de validade de 60 dias após a reconstituição e armazenar a temperatura ambiente.

ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

- Remover o *kit* de diagnóstico (*D³ Ultra™ DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit*) da geladeira e deixar à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos antes da sua utilização.
- Retirar a lâmina contendo a suspensão celular fixada da geladeira ou *freezer* e deixar a temperatura ambiente.
- Colocar a lâmina em uma câmara úmida (caixa plástica tendo o fundo revestido com papel toalha umedecido).
- Adicionar uma gota (25 μ L) dos diferentes anticorpos monoclonais (screening, adenovírus, influenza A, influenza B, parainfluenza 1, parainfluenza 2, parainfluenza 3, vírus respiratório Sincicial e *Normal Mouse Gamma Globulin*) em distintos círculos da lâmina.
- Incubar a 37°C por 30 minutos para que ocorra a reação antígeno-anticorpo.

- Lavar as lâminas em solução de lavagem 1x, para uma lavagem eficaz mergulhe e retire a lâmina no recipiente da solução de lavagem por pelo menos quatro vezes.
- Descartar a solução de lavagem usada e repetir a etapa de lavagem com nova solução de lavagem 1x.
- Lavar as lâminas em água destilada, para uma lavagem eficaz mergulhe e retire a lâmina no recipiente com água destilada por pelo menos quatro vezes.
- Posicionar a lâmina verticalmente, sobre uma folha de papel-toalha, para retirar o excesso de água destilada.
- Adicionar uma pequena gota (10 μ L) do fluido de montagem sobre o centro de cada spot da lâmina.
- Posicionar, cuidadosamente, uma lamínula sobre a lâmina evitando a formação de bolhas de ar entre as duas superfícies.
- Examinar ao microscópio de imunofluorescência com objetiva de 40x e ocular de 10x.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A lâmina deve exibir no mínimo três células por campo para ser adequada à detecção. Um número insuficiente de células pode levar a resultados falso-negativos. A fluorescência é reconhecida como coloração verde-maçã intensa sempre localizada no interior da célula. O padrão de coloração é geralmente granular, porém grandes inclusões podem estar homogeneamente coradas. Qualquer coloração extracelular

ou fragmentos de células mostrando fluorescência devem ser considerados como inespecíficos. Três ou mais células por campo intactas mostrando padrão específico de fluorescência podem ser aceitas como resultado positivo.

QUADRO 2

Interpretação dos resultados

VÍRUS OU GRUPO DE VÍRUS	PADRÃO DE FLUORESCÊNCIA
Influenza	A fluorescência é citoplásmica, nuclear ou ambos. Citoplasmática é muitas vezes pontuada com grandes inclusões, enquanto a coloração nuclear é uniformemente brilhante.
Parainfluenza	A fluorescência é citoplasmática com aspecto de grânulos finos.
VSR	A fluorescência é citoplasmática e pontuada com pequenas inclusões nos sincícios.
Adenovírus	A fluorescência é citoplásmica, nuclear ou ambos. É pontuada no citoplasma e brilhante no núcleo.

Fonte: DIAGNOSTIC HYBRIDS, ©2011.

O padrão de negatividade é evidenciado pela ausência de fluorescência específica e o predomínio de uma coloração avermelhada nas células devido à presença do azul de Evans nos reagentes do *kit*.

Sempre que um novo *kit* for aberto, testar as lâminas controles contidas nele, assim, após a leitura das lâminas e a obtenção dos resultados esperados (controle positivo = resultado positivo e controle negativo = resultado negativo), o *kit* deve ser liberado para ser utilizado na rotina de detecção e identificação de antígenos virais em células infectadas diretamente das secreções de nasofaringe ou nas culturas celulares.

LIMITAÇÕES

Uma vez que as células epiteliais infectadas com vírus são extremamente lábeis e facilmente danificadas, deve-se garantir o correto manuseio e agilidade no processamento das amostras. Outro ponto importante é assegurar que as amostras clínicas a serem submetidas à técnica de imunofluorescência sejam imediatamente refrigeradas após a coleta e mantidas nesta temperatura até o seu processamento. A centrifugação das amostras contendo células não deve ser superior a 1.000 rpm, sob o risco de ocasionar rompimento celular. Deve-se levar em consideração ainda, que o número de células infectadas obtidas por *swab* ou aspirado decresce durante o curso da infecção. Assim sendo, os espécimes clínicos devem ser obtidos o mais cedo possível após o aparecimento dos sintomas, preferencialmente nos primeiros cinco dias de início dos sintomas.

3.8 EXTRAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO VIRAL

Existem vários *kits* comerciais disponíveis para extração de ácido nucleico viral. Utilizando esses *kits* é possível obter boa quantidade de RNA purificado. Os procedimentos para extração de ácido nucleico viral devem ser testados e validados antes de utilização na rotina. A extração deve ser realizada segundo as orientações do fabricante. O ácido nucleico extraído deve ser imediatamente utilizado para o diagnóstico molecular ou armazenado a -70°C até o uso.

O fluxo de trabalho deve ser sempre da área limpa para a área de amplificação. A área de preparação das reações deve, obrigatoriamente, ser diferente da área em que são feitos os trabalhos de análise do material já amplificado. Os equipamentos e consumíveis devem ser mantidos separados por áreas de manipulação dos reagentes do ensaio, manipulação dos ácidos nucleicos extraídos e amplificação. Cuidados especiais devem ser tomados para evitar possíveis contaminações cruzadas através da formação de aerossóis durante manipulação. Todos os plásticos utilizados devem ser novos, livres de RNase, DNase e pirógeno. As ponteiros devem, além dessas características, necessariamente conter barreira de proteção. Armazenar reagentes e *kits* em temperaturas apropriadas (observar as instruções dos reagentes). Não utilize reagentes após a data de validade. A descontaminação de bancadas, superfícies do laboratório e utensílios pode ser realizada com hipoclorito a 5% e/ou soluções comerciais utilizadas para

remoção de contaminantes moleculares. Antes e após os procedimentos, o interior da cabine de segurança biológica e as pipetas devem ser descontaminadas com hipoclorito 5% e/ou soluções comerciais utilizadas para remoção de contaminantes moleculares. Em seguida, deixar a luz UV acionada por 15 minutos.

3.8.1 Extração de Ácido Nucleico – kit “QIAamp Viral RNA Mini Kit”

Este protocolo descreve o método de extração pelo “QIAamp Viral RNA Mini Kit”, mas outros *kits* podem ser utilizados. O método desse *kit* se baseia na propriedade de ligação de moléculas de RNA a uma membrana de sílica em gel (QIAamp spin columns) durante as etapas de lavagem descritas pelo fabricante. A amostra é primeiro lisada sob condições desnaturantes (tampão AVL) para inativar RNases e assegurar a liberação do RNA da amostra. Condições tamponantes são então ajustadas para permitir uma ligação ótima do RNA à membrana QIAamp. Contaminantes são eliminados em duas etapas de lavagem sucessivas usando os tampões AW1 e AW2. O RNA é então eluído com o tampão AVE, podendo ser imediatamente usado ou estocado a -80°C.

CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

- O ensaio deve ser realizado utilizando jaleco e luvas.
- O descarte dos tampões, álcool e guanidina, devem ser realizados em recipientes específicos, previamente identificados para posterior descarte como lixo químico.

- O descarte dos consumíveis utilizados no ensaio deve ser feito em recipiente com saco de biossegurança para posterior autoclavação.
- O sal caotrópico do tampão AVL e AW1 é irritante, portanto, o uso de luvas é indispensável. Não misture este tampão com reativos contendo hipoclorito.
- A adição da amostra no tampão caotrópico AVL deve ser realizada em cabine de segurança biológica, em sala de processamento de amostras. Após a incubação da amostra no tampão caotrópico AVL e adição do etanol, o procedimento pode ser realizado na bancada de sala de extração.
- Os tampões AW2 e AVE contêm azida sódica. A azida é altamente tóxica, além de reagir com metais podendo gerar gases explosivos.

EQUIPAMENTOS

- Micropipetas para os volumes de 100 μL , 200 μL e 1.000 μL .
- Cabine de segurança biológica com luz UV.
- Vortex.
- Microcentrífuga para tubos de 1,5 mL.
- Freezer -20°C e -70°C.
- QIAcube (no caso da extração automática).
- QIAvac (no caso da extração à vácuo).

MATERIAL/REAGENTES

- Ponteiras estéreis livres de nucleases e pirogênio com filtro.
- Tubos de 1,5 mL livres de nucleases e pirogênio.
- Recipientes para descarte de ponteiras, etanol e guanidina devidamente separados e identificados.
- Luvas sem talco.
- Jaleco.
- Máscara.
- Gaze ou papel absorvente.
- Caneta com tinta resistente a água para identificação dos tubos.
- Estante gelada para tubos.
- Etanol absoluto PA.
- QIAamp Viral RNA Mini *Kit*.
- Colunas spin QIAamp.
- Tubos coletores.
- Tampão AVL.
- Tampão AW1 (concentrado).
- Tampão AW2 (concentrado).
- Tampão AVE.
- Carreador de RNA (poly A).

- Adaptadores plásticos para o QIAcube.
- Adaptadores plásticos para o QIAvac.

PROCEDIMENTO

1. Equilibrar as amostras à temperatura ambiente (TA 15 a 25°C). Todos os passos de centrifugação são feitos a TA.
2. Equilibrar o tampão AVE a TA para posterior eluição.
3. Verificar se os tampões AW1 e AW2 foram diluídos com etanol PA como descrito pelo fabricante.
4. Preparar o tampão AVL no momento em que for utilizá-lo, adicionando RNA carreador. Para cada 560 μL de tampão AVL, deverá ser adicionado 5,6 μL de RNA carreador.
5. Preparar o RNA carreador adicionando 310 μL de tampão AVE ao tubo contendo 310 μg de RNA carreador liofilizado para obter solução final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.
6. É necessário incluir um controle negativo (amostra sabidamente sem o RNA investigado).
7. Pipetar 560 μL do tampão AVL, contendo o RNA carreador, em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
Nota: Caso o volume da amostra seja maior que 140 μL , aumentar a quantidade de tampão AVL proporcionalmente. Ex.: para 280 μL de amostra, colocar 1.120 μL de tampão.
8. Adicionar 140 μL da amostra (secreção ou sobrenadante de cultura celular) no tubo de microcentrífuga contendo o tampão AVL. Misturar por 15s.

Nota: Para garantir eficiente lise, é essencial que a amostra seja completamente misturada ao tampão AVL, obtendo-se solução homogênea.

9. Incubar a TA por 10 min. A lise da partícula viral é completa depois de 10 min a TA.
Nota: Tempos de incubações superiores a 10 min não aumentam o rendimento ou a qualidade do RNA purificado. Agentes infecciosos e RNAses também são inativados em tampão AVL.
10. Centrifugar rapidamente o tubo de 1,5 mL para remover gotículas da tampa.
11. Adicionar 560 μL de etanol (96 a 100%) à amostra, e misture 15 s com auxílio do vortex.
Nota: Somente etanol pode ser usado, outros álcoois podem reduzir a quantidade e pureza do RNA. Se o volume da amostra for maior que 140 μL , proceder como descrito no item 7. Para eficiente ligação entre o RNA e a membrana à amostra, nesta etapa uma solução homogênea deverá ser obtida.
12. Centrifugar rapidamente o tubo para remover as gotículas da tampa.
13. Se for utilizar o QIAvac para realizar a extração manual, encaixar os adaptadores e os filtros nas saídas de ar, ligar a bomba deixando a válvula de controle fechada.

14. Aplicar cuidadosamente 630 μL da mistura à coluna QIAamp spin (em um tubo coletor de 2 mL) sem tocar a borda (se for prosseguir com a utilização do QIAvac pule para o passo "24").
15. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 min; descartar o eluato.
16. Fechar bem cada coluna para evitar contaminação cruzada durante a centrifugação. Caso o volume do lisado, não passe completamente pela membrana, centrifugar novamente.
17. Abrir cuidadosamente a coluna QIAamp spin, e repita os passos "15" ao "17". Caso o volume da amostra seja maior que 140 μL , repetir esse passo até todo lisado passar pela coluna.
18. Colocar a coluna em um tubo coletor limpo de 2 mL (fornecido pelo *kit*) e descartar o eluato no recipiente determinado e os plásticos como resíduo químico sólido.
19. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 500 μL do tampão AW1. Fechar a tampa e centrifugar a 8.000 rpm/1 min.
Nota: Não é necessário aumentar o volume do tampão AW1 mesmo que o volume inicial da amostra seja maior que 140 μL .
20. Colocar a coluna em um tubo coletor limpo de 2 mL (fornecido pelo *kit*) e descartar o eluato e os plásticos.
21. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 500 μL do tampão AW2. Centrifugar a 14.000 rpm/3 min.
22. Colocar a coluna em um novo tubo coletor (não fornecido pelo *kit*) e descartar o tubo coletor usado com o eluato. Centrifugar a velocidade de 14.000 rpm/1 min (pular para o passo "27").
23. Abrir a válvula de controle e aguardar aproximadamente 15 s, até todo o eluente passar pela coluna. Fechar a válvula de controle.
24. Repetir os passos de "15" a "23", abrindo e fechando a válvula de controle do QIAvac em vez de centrifugação.
Nota: Nos passos "20" e "22", utilize 700 μL do tampão AW1 e AW2, respectivamente.
25. Fechar as colunas e seguir para o passo "28".
26. Colocar a coluna em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL livre de nucleases (não fornecido). Descartar o tubo coletor usado contendo o eluato.
27. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar, no centro da base da coluna (sílica), 80 μL de AVE para ressuspensão.
28. Fechar a tampa e incube a TA por 1 min. Centrifugar a 8.000 rpm/1 min.
29. O RNA viral eluído é estável por mais de 1 ano se estocado à -70°C .

3.8.2 Extração de Ácido Nucleico – Kit “High Pure Nucleic Acid Kit”

Este protocolo descreve o método de extração pelo “High Pure Nucleic Acid Kit”, mas outros kits podem ser utilizados. Após lise viral durante incubação com tampão de lise/ligação na presença de proteinase K, a amostra é misturada com um sal caotrópico e aplicada em fibra de lã de vidro em colunas *High Pure Spin Filter Tube*. Sob as condições dos tampões utilizados nesse procedimento, os ácidos nucleicos virais se ligam à fibra de vidro, enquanto as substâncias contaminantes (sais, proteínas, nucleotídeos, óleo mineral e outros contaminantes) não se ligam. Sucessivas etapas de lavagem e centrifugação prontamente removem esses contaminantes. Uma vez purificado, o RNA viral pode ser facilmente eluído em pequenos volumes para uso imediatamente ou estocado a -80°C.

CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

- O ensaio deve ser realizado utilizando jaleco e luvas.
- O descarte dos tampões, álcool e guanidina, devem ser realizados em recipientes específicos, previamente identificados para posterior descarte como lixo químico.
- O descarte dos consumíveis utilizados no ensaio deve ser feito em recipiente com saco de biossegurança para posterior autoclavação.
- O sal caotrópico dos tampões “Binding Buffer” e “Inhibitor Removal Buffer” é irritante, portanto, o uso de luvas é

indispensável. Não misture este tampão com reativos contendo hipoclorito.

- A adição da amostra na “Working Solution + proteinase K” deve ser realizada em cabine de segurança biológica. Após a incubação da amostra e adição do “Binding Buffer”, o procedimento pode ser realizado na bancada.

EQUIPAMENTOS

- Micropipetas para os volumes de 100 µL, 200 µL e 1.000 µL.
- Cabine de segurança biológica com luz UV.
- Vortex.
- Microcentrífuga para tubos de 1,5 mL.
- Freezer -20°C e -70°C.

MATERIAL/REAGENTES

- Ponteiras estéreis livres de nucleases e pirogênio com filtro.
- Microtubos de 1,5 mL livres de nucleases e pirogênio.
- Recipientes para descarte de ponteiras, etanol e guanidina devidamente separados e identificados.
- Luvas sem talco.
- Jaleco.
- Máscara.
- Gaze ou papel-absorvente.

- Caneta com tinta resistente à água para identificação dos tubos.
 - Estante gelada para tubos.
 - Etanol absoluto PA.
 - High Pure Viral Nucleic Acid Kit.
 - Tampão “Working Solution”.
 - Carreador de RNA (poly A).
 - Proteinase K.
 - Tampão “Binding Buffer”.
 - Tampão “Inhibition Removal Buffer”.
 - Tampão “Elution Buffer”.
 - Tampão “Wash Buffer”.
 - Tubos coletores.
2. Preparar a Proteinase K (100 mg liofilizada), dissolvendo em 5mL de tampão “Elution Buffer” e armazenar alíquotas de -15°C a -25°C.
 3. Adicionar 20 mL de etanol absoluto ao tampão “Inhibitor Remover Buffer” (33 mL).
 4. Adicionar 40 mL de etanol absoluto a cada frasco de tampão “Wash Buffer” (2 x 10 mL).
 5. Preparar a “Working Solution”:
 - ▶ Descongelar um tubo de carreador de RNA e adicionar 2,5 mL de “Binding Buffer”.
 - ▶ Essa solução não deve ser estocada. Ela deve ser preparada a cada extração. No caso de sobra, pode ser mantida a temperatura ambiente (TA: 15°C a 25°C), mas deve ser utilizada em poucos dias.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

1. O Carreador de RNA (poly A) deve ser dissolvido no tampão “Elution Buffer”:
 - ▶ Adicionar 500 μ L de tampão “Elution Buffer” ao microtubo contendo o carreador de RNA. Fechar e inverter o tubo várias vezes até estar completamente dissolvido. Fazer pequenas alíquotas de 50 μ L e armazenar de -15°C a -25°C.

PROCEDIMENTO

1. Pipetar 200 μ L do tampão “Working Solution” (tampão “Binding Buffer” contendo o RNA carreador), em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

Nota: Caso o volume da amostra seja maior que 200 μ L, aumente a quantidade de tampão “Working Solution” e proteinase K proporcionalmente. Ex.: para 300 μ L da amostra coloca-se 300 μ L de tampão e 75 μ L de Proteinase K.

2. Adicionar 2.000 μ L da amostra (secreção ou sobrenadante de cultura celular) no tubo de microcentrífuga contendo

o tampão “Working Solution” e proteinase K. Misture por 15 s.

Nota: Para garantir eficiente lise, é essencial que a amostra seja completamente misturada ao tampão obtendo-se uma solução homogênea.

3. Incubar por 10 min a 72°C (A lise da partícula viral é completa depois de 10 min).

Nota: Tempos de incubações superiores a 10 min não aumentam o rendimento ou a qualidade do RNA purificado. Agentes infecciosos e RNases também são inativados no tampão “Working Solution”.

4. Centrifugar rapidamente o tubo de 1,5 mL para remover gotículas da tampa.
5. Adicionar 100 μ L do tampão “Binding Buffer”, e misture 15 s com auxílio do vortex.
Nota: Para uma eficiente ligação entre o RNA e o filtro, deve-se obter nesta etapa uma solução homogênea.
6. Centrifugar rapidamente o tubo para remover as gotículas da tampa.
7. Aplicar cuidadosamente toda mistura à coluna “high pure filter tube” (em um tubo coletor de 2 mL) sem tocar a borda.
8. Centrifugar a 8.000 x g por 1 min. Descartar o tubo coletor transferindo o “filter tube” para um novo tubo coletor.

9. Adicionar 500 μ L de tampão “Inhibitor Removal Buffer” ao “filter tube” e centrifugar conforme o item 8.

10. Adicionar 450 μ L de tampão “Wash Buffer” e repetir a centrifugação conforme item 8.

11. Repetir essa etapa de lavagem, item 10.

12. Centrifugar por 10 s a velocidade máxima (~13.000 x g) para remover tampão “Wash Buffer” residual.

13. Descartar o tubo coletor e inserir o filtro em um microtubo de 1,5 mL

14. Adicionar 80 μ L de tampão “Elution Buffer”. Centrifugar 8.000 x g por 1 min.

15. O RNA viral eluído é estável por mais de 1 ano se estocado à -70°C.

3.9 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O protocolo de detecção molecular dos vírus influenza A e B por RT-PCR, baseia-se num painel de oligonucleotídeos e sondas Taqman® específicas. As sondas específicas para cada gene são duplamente marcadas com uma molécula fluorescente (“reporter”) na extremidade 5’ e outra molécula silenciadora (“quencher”) na extremidade 3’ ou numa Timidina interna. Enquanto a sonda está intacta, a fluorescência emitida pela molécula repórter é capturada pela molécula quencher (efeito FRET). A primeira etapa do ensaio consiste na desnaturação do DNA. Durante a etapa de

hibridização, a sonda e os *primers* ligam-se especificamente ao alvo. Na fase de extensão, a atividade nuclease da Taq polimerase cliva a sonda, e a molécula quencher é então fisicamente separada da molécula repórter, permitindo que a última emita sinal fluorescente. Moléculas adicionais de sonda são clivadas a cada ciclo, resultando no aumento da intensidade fluorescente, que é proporcional à quantidade de amplicon produzido. As amostras positivas apresentam sinal de fluorescência emitido (Rn) acima do ponto de corte do teste (threshold), que deve ser manualmente posicionado na fase exponencial da curva de amplificação da reação. Adicionalmente, os valores de Ct (ciclo no qual a fluorescência emitida atravessa o threshold) devem ser observados. Quanto menor o valor de Ct, maior a concentração de moléculas alvo na amostra.

O conjunto de *primers* e sonda denominada InfA, foram desenvolvidos para detecção universal de influenza tipo A (alvo: gene M). O conjunto InfB foi desenvolvido para detecção universal dos vírus influenza B (alvo: gene NEP). O conjunto pdmInfA foi desenvolvido para detecção de influenza A de origem suína (alvo NP). Os conjuntos HA H1, H1pdm e HA H3 foram desenvolvidos para detecção do gene da hemaglutinina de cada subtipo especificamente, como identificado em sua nomenclatura. O conjunto RNP tem como alvo o gene da RNase P humana, servindo como controle para a etapa de extração anterior a esta reação.

CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

- O ensaio deve ser realizado utilizando jaleco e luvas.
- O descarte das ponteiras e luvas deve ser realizado nos recipientes designados nas respectivas salas como material contaminado, para posterior autoclavagem.

CONDIÇÕES GERAIS

- Devem-se manter equipamentos (ex.: pipetas, microcentrífugas) e consumíveis (ex.: tubos de microcentrífuga, ponteiras de pipetas, jalecos e luvas), separados por áreas de manipulação dos reagentes do ensaio, manipulação dos ácidos nucleicos extraídos e amplificação (RT-PCR).
- O fluxo de trabalho deve ser sempre da área limpa para a área de amplificação.
- Utilizar jalecos descartáveis e luvas sem talco descartáveis, limpas e novas durante a manipulação dos reagentes do ensaio e dos ácidos nucleicos extraídos. Trocar as luvas sempre que suspeitar que elas possam estar contaminadas.
- Todos os plásticos utilizados devem ser novos, livres de RNase, DNase e pirogênio. As ponteiras devem, além dessas características, necessariamente conter barreira de proteção a aerossóis.
- Limpar e descontaminar as superfícies antes e após o procedimento.

- Armazenar oligonucleotídeos, sondas e a mistura de enzimas em temperaturas apropriadas (de acordo com as instruções dos reagentes). Não utilize reagentes após a data de validade.
- Manter os tubos dos reagentes e das misturas gelados durante todo o período de preparação e mantê-los tampados sempre que possível.
- Após a adição da mistura de enzimas o tubo não poderá ser vortexado. Homogenizar a mistura por inversão, centrifugando ao final.
- Não levar ácidos nucleicos extraídos ou produtos da reação de PCR para a área de manipulação de reagentes.

EQUIPAMENTOS

- Pipetadores automáticos de 2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 200 μ L, 1.000 μ L.
- Microcentrífuga para tubos de 0,5 mL e 1,5 mL.
- Centrífuga de placa de 96 poços.
- Vortex.
- Estação de trabalho para PCR.
- Termociclador com sistema de detecção de PCR em tempo real. Os seguintes equipamentos foram testados pelo LRN com funcionamento garantido: ABI 7.500 Standard ou Fast, ABI StepOnePlus. Outros equipamentos não testados no LRN, mas também recomendados pelo desenvolvedor

do protocolo: Bio-RAD CFX96 PCR detection system e Mx3000P QPCR System.

MATERIAL/REAGENTES

- Tubo de 1,5 mL livre de nucleases e pirogênio para preparação das misturas.
- Placas ou tubos de reação de 0,2 mL para blocos padrão ou 0,1 mL no caso dos ABI 7500 fast ou StepOnePlus.
- Filme adesivo óptico ou tampas ópticas em tiras de oito tampas.
- Ponteiras com filtro, livres de nucleases e pirogênio.
- Estante gelada para tubos de 0,5 mL, 1,5 mL e placas de 96 poços.
- Recipientes para descarte de ponteiras e resíduos.
- Luvas sem talco.
- Jaleco descartável.
- Gaze ou papel-absorvente.
- Caneta com tinta resistente à água para identificação dos tubos.

PROCEDIMENTO

1. Preparação da mistura do rRT-PCR (sala de Pré-PCR).
2. Descongelar os *primers* e sondas. Vortexar os *primers* e centrifugar.

3. Atenção! As sondas devem ser homogenizadas preferencialmente por inversão. Evite vortexá-las. As sondas não devem ser congeladas novamente, podendo ser mantidas em geladeira ao abrigo da luz por até três meses.
4. Em banho de gelo, adicionar todos os reagentes da mistura em tubo de 1,5 mL, conforme descrito na Tabela 3. Deverá ser feita uma mistura para cada um dos alvos usados. De acordo com os alvos a serem testados.
5. Distribuir 20,0 μ L da mistura nos poços da placa de 96 orifícios como previamente identificados nas fichas de trabalho para os diferentes ensaios.
6. Cada controle e amostras serão testados em paralelo para os conjuntos de *primers* e sondas desejados. Para caracterização rotineira de influenza sazonal são necessários os conjuntos: InfA, InfB, pdmInfA, AH1, PdmH1, AH3, RNP, no caso da subtipagem de amostras positivas para influenza A.
7. A cada ensaio, deverão ser adicionados os controles: NTC (controle negativo da PCR), MOCK (controle negativo da extração) e PTC (controle positivo fornecido pelo CDC ou RNA de amostras já caracterizadas e isoladas).
8. Nos orifícios destinados ao NTC devem ser pipetados 5,0 μ L da água usada nas misturas no lugar de RNA. Este volume de H₂O deve ser distribuído na sala limpa e funcionará como controle dos reativos.
9. Na sala de extração, pipetar 5,0 μ L do controle negativo de extração (MOCK) nos orifícios predeterminados. No caso de estar usando tiras de tubos, recomenda-se fechar os poços após a adição de cada controle ou amostra.
10. Ainda na sala de extração, adicionar 5,0 μ L do RNA extraído de cada amostra nos orifícios específicos (colunas). Mantenha a placa ou os tubos em banho de gelo durante todo o procedimento. Para maior comodidade, estantes geladas podem ser usadas.
11. Pipetar 5,0 μ L do PTC (controle positivo) nos respectivos orifícios.
12. Cobrir a placa com filme adesivo óptico ou tampas em tiras.
13. Centrifugar a placa em centrífuga com rotor do tipo balanço (*swing bucket*).
14. Transportar os tubos ou a placa para o equipamento de PCR em tempo real e execute o seguinte programa: 50°C/30 min (transcrição reversa), 95°C/2 min (ativação enzimática), seguidos de 45 ciclos de 95°C/15 s e 55°C/30 s (amplificação). A leitura da fluorescência será feita no passo 55°C/30 s de cada ciclo.

ATENÇÃO: Manter as misturas e as placas de 96 poços com mistura distribuída ao abrigo da luz o máximo possível. Após a adição do mix de enzimas a mistura não poderá ser congelada.

TABELA 3**Mistura para rRT - PCR (1 reação) – Protocolo Invitrogen**

REATIVOS	VOLUME POR REAÇÃO (L)
H ₂ O livre de DNase, RNase	5,5
Oligo direto (40 μM)	0,5
Oligo reverso (40 μM)	0,5
Sonda marcada (10 μM)	0,5
SSIII+Taq Platinum mix	0,5
RT-PCR master mix (2x)	12,5
Volume total	20,0

Fonte: Center Diseases of Control and Prevention, 2009.

Obs.: Na tabela anterior temos o volume suficiente para uma amostra. Para obter o volume total, multiplique os volumes pelo número de amostras a serem processadas + 1, se forem processadas até 14 reações. Para números superiores, adicione + 2 reações, devido às perdas de pipetagem.

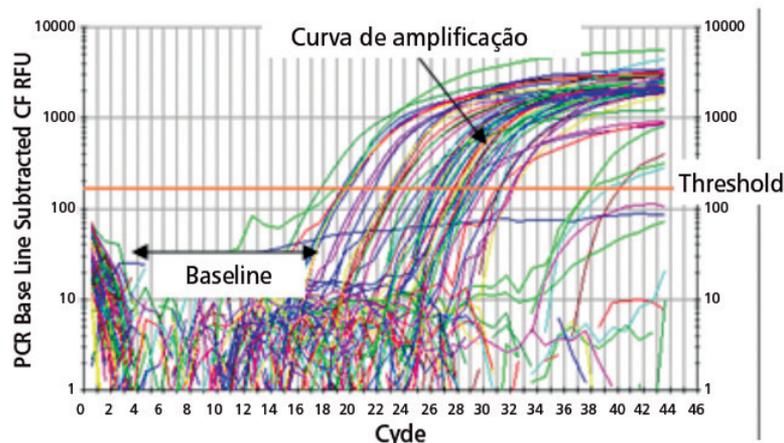
VALIDAÇÃO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**ANÁLISES PRELIMINARES**

1. Análise do baseline e threshold. Para obter valores precisos de Ct é crucial o ajuste correto destes dois parâmetros.
2. O baseline deve ser estabelecido entre o ciclo 3 e o ciclo onde se inicia a amplificação (gráfico na apresentação linear).
3. O threshold deve ser estabelecido acima do baseline e na fase exponencial da curva de amplificação (gráfico na apresentação logarítmica).

4. Para cada amostra, verificar a forma das curvas de amplificação (logarítmica), de cada conjunto. Curvas de amplificação características apresentam a fase exponencial de amplificação e a fase de plateau, conforme ilustrado ao lado (Figura 6).

FIGURA 6

Gráfico dos ciclos de amplificação de amostras gerado por reação em tempo real



Fonte: Figura cedida pelo Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo da Fiocruz/RJ.

VALIDAÇÃO DO ENSAIO

1. O ensaio é válido se: nenhum dos poços do NTC ou do MOCK apresentarem curva de amplificação que ultrapassem o threshold, e
2. Os poços do PTC apresentarem curvas de amplificação características e que ultrapassem o threshold para todos os conjuntos testados até o ciclo 40. Os valores de Ct para os controles são em torno de 32. A depender do controle usado, podem não ser observadas curvas de amplificação para o conjunto RNP.
3. Em caso de não atendimento a estes critérios, a reação será inválida e deverá ser repetida, após análise crítica das possíveis causas.
4. Todas as amostras clínicas devem apresentar positividade para o gene RNP até o ciclo 37, indicando a qualidade adequada da amostra. A não amplificação é indicativa de extração inadequada, ausência ou insuficiência de material, problemas na execução do ensaio ou equipamento. Incondicionalmente, estas amostras devem ser reextraídas e retestadas.
5. Uma amostra é considerada positiva quando a curva de amplificação para InfA é detectada até o Ct 40.
6. Caso a reação seja positiva para InfA, também deve ser positiva para algum subtipo, rotineiramente H1pdm09 ou H3. No caso de positividade apenas para InfA, a amostra deverá ser encaminhada ao laboratório de referência para novos testes de subtipagem.
7. Uma amostra é considerada positiva para AH1pdm09 quando além de InfA, os marcadores pdmInfA e pdmH1 apresentam curva de amplificação com $Ct \leq 40$; e para RNP $Ct \leq 37$.
8. Uma amostra é considerada H3 quando além de InfA, AH3 apresenta curva de amplificação com $Ct \leq 40$; e para RNP $Ct \leq 37$.
9. Uma amostra é considerada positiva para H3variante (H3v) quando além de InfA, pdmInfA e AH3 apresentam curva de amplificação com $Ct \leq 40$; e para RNP $Ct \leq 37$.
10. Uma amostra é considerada positiva para influenza B, quando apenas os conjuntos InfB e RNP apresentam curvas de amplificação com $Ct \leq 40$ e $Ct \leq 37$, respectivamente.
11. Uma amostra é considerada negativa quando for detectada curva de amplificação apenas para o conjunto RNP, até o Ct de 37.
12. A Tabela 4 ilustra os alvos específicos que deverão ser detectados para cada tipo/subtipo viral.

TABELA 4

Tipagem e subtipagem viral de acordo com amplificação e valores de Ct para os marcadores moleculares (alvos específicos)

TIPO	SUBTIPO	ALVO ESPECÍFICO (VALOR DE CT)						
		INFA	INFB	AH1	AH3	PDMH1	PDMINFA	RNP
Influenza A	H1N1pdm09	≤40	-	-	-	≤40	≤40	≤37
	H3	≤40	-	-	≤40	-	-	≤37
	H3v	≤40	-	-	≤40	-	≤40	≤37
	H1N1	≤40	-	≤40	-	-	-	≤37
	Inconclusivo	≤40	-	-	-	-	-	≤37
Influenza B	-	-	≤40	-	-	-	-	≤37
Não detectável	-	-	-	-	-	-	-	≤37

Fonte: Center Diseases of Control and Prevention, 2009.

LIBERAÇÃO DOS RESULTADOS E EMISSÃO DE LAUDOS

- Os laudos de resultados deverão ser liberados conforme o modelo estabelecido no laboratório, após a avaliação cuidadosa da ficha epidemiológica que acompanha cada amostra.
- Os resultados deverão ser inseridos no GAL.
- O valor de Ct, obtido na reação de RT-PCR com detecção em tempo real, deverá ser informado no GAL com o resultado da tipagem/subtipagem viral no campo "valor de Ct".
- O campo "valor de Ct" é de preenchimento obrigatório. Nele deve ser informado o valor obtido para a curva de amplificação do alvo específico para cada tipo/subtipo viral de acordo com a Tabela 5.
- No caso da detecção dos marcadores para influenza A H3 variante, incluir essa informação no campo de "observações" do GAL.

TABELA 5

Marcador que deverá ser utilizado para preenchimento no GAL do valor de Ct da curva de amplificação de acordo com o tipo/subtipo viral

TIPO	SUBTIPO	ALVO ESPECÍFICO
Influenza A	H1N1pdm09	<i>pdmH1</i>
	H3	<i>AH3</i>
	H1N1	<i>AH1</i>
	Inconclusivo	<i>InfA</i>
Influenza B	-	<i>InfB</i>
Não detectável	-	<i>RNP</i>

Fonte: Center Diseases of Control and Prevention, 2009.

Página intencionalmente branca

AQUISIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE INSUMOS

A importância dos *kits* de diagnóstico na rede de laboratórios (Sislab) e o percentual de recursos disponibilizados para estes insumos justificam a adoção de medidas que possibilitem o uso racional, assegurando aos usuários os produtos solicitados nas quantidades e nas especificações necessárias de forma segura e no prazo estabelecido, além da logística de armazenamento e distribuição realizada pela equipe de Insumos da Coordenação-Geral de Laboratórios (CGLAB).

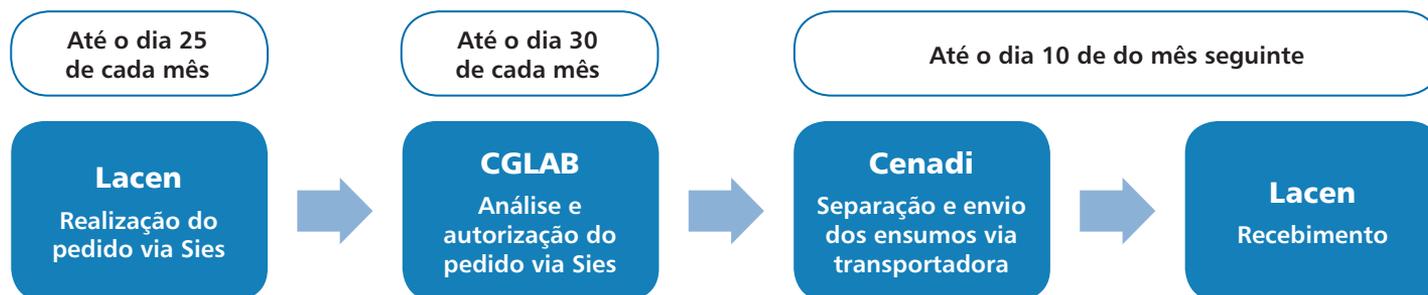
O Sistema de Informação de Insumos Estratégicos (Sies) é a ferramenta utilizada para o controle administrativo dos insumos distribuídos pela SVS. Por meio desse sistema é possível o gerenciamento logístico dos processos de distribuição e controle de estoque dos reativos para diagnóstico, além da obtenção de informações para o planejamento anual das aquisições.

A Central Nacional de Armazenamento e Distribuição de Imunobiológicos (Cenadi) tem o objetivo de distribuir (via empresa de transporte contratada) os insumos estratégicos do Ministério da Saúde para todo o território nacional. Além de analisar o controle de estoque dos insumos, o órgão é responsável por monitorar a entrada no País de insumos diagnósticos e imunobiológicos adquiridos pelo Ministério da Saúde. Todos os insumos de sorologia devem seguir o cronograma apresentado no fluxo a seguir.

Atualmente, para o diagnóstico de influenza, o Ministério da Saúde distribui dois tipos de insumo diagnóstico: *kit* (insumos) de Biologia Molecular e *kit* de Imunofluorescência sendo que cada um deles possui uma via de solicitação.

a) *Kit* de Imunofluorescência: o quantitativo mensal planejado pelo Lacen deve ser solicitado via Sies até o dia 25 de cada mês. A CGLAB tem até o dia 30 para avaliar e autorizar os pedidos e a Cenadi até o dia 10 do mês seguinte para realizar a entrega dos *kits*.

b) Insumos para Biologia Molecular (vários fabricantes): O quantitativo mensal planejado pelo Lacen deve ser solicitado via *e-mail* institucional até o dia 25 de cada mês. A CGLAB tem até o dia 30 para avaliar e autorizar os pedidos e a Cenadil até o dia 10 do mês seguinte para a realização da entrega dos *kits*.



ALGUNS PONTOS TÉCNICOS DEVEM SER ABORDADOS, A FIM DE MELHORAR A ROTINA DE DISTRIBUIÇÃO

- A Cenadi não funciona aos fins de semana, por esse motivo o prazo para entrega dos *kits* pode variar.
- Pedidos de urgência (ex.: casos de surtos, entre outros) podem ser solicitados via Sies (marcando a opção “urgente”) ou por *e-mail* com uma justificativa que deve ser inserida no campo de observação do pedido no Sies, ou *e-mail* e que será analisada pela CGLAB.
- Os estados que optarem pela entrega descentralizada de *kits* devem realizar o pedido via Sies separadamente, com as informações (endereço completo, telefone e nome do responsável) do local de entrega e comunicação complementar a CGLAB via *e-mail*.
- Para cadastro de usuário no Sies, deve ser enviada solicitação a CGLAB via *e-mail* e o preenchimento de formulário com os dados do usuário e instituição a que está vinculado, após avaliação será realizado a inclusão do novo usuário no sistema.
- Os Lacens devem estar atentos para as condições de entrega dos insumos (desvio de temperatura, danos físicos) e a correta comunicação do endereço de entrega, a fim de evitar transtornos nos períodos de abastecimento.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR NM ISO 15189: Laboratórios de Análises Clínicas: requisitos especiais de qualidade e competência.** 2008. Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=1771>>. Acesso em: 22 maio 2015.

BARROS, F. R. et al. O desafio da influenza: epidemiologia e organização da vigilância no Brasil. **Boletim Eletrônico Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde**, [S.l.], v. 1, p. 1-7, 2004. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/16/Ano04-n01-desafio-influenza-br-completo.pdf>>. Acesso em: 22 maio 2015.

BIOSAFETY in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL). 5th ed. 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/>>. Acesso em: 1 Dec. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia.** Brasília, 2006. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Laboratorios/Assuntos+de+Interesse/Publicacoes>>. Acesso em: 22 maio 2015.

_____. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde.** Brasília, 2014. 812 p. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/27/guia-vigilancia-saude-linkado-27-11-14.pdf>>. Acesso em: 22 maio 2015.

_____. Ministério da Saúde. **Protocolo de Manejo Clínico de Síndrome Respiratória Aguda Grave – SRAG.** Brasília, 2010.

Disponível em: <http://www.into.saude.gov.br/upload/arquivos/pacientes/campanhas/2011/manejo_influenza.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2010.

_____. Ministério da Saúde. **Vírus Respiratório: normas e procedimentos no diagnóstico laboratorial por imunofluorescência indireta.** Brasília, 2006.

BUSTIN, S. A. (Ed.). **A-Z of Quantitative PCR.** [S.l.]: International University Line, 2004.

CENTER DISEASES OF CONTROL AND PREVENTION. **CDC Realtime RTPCR (rRTPCR) Protocol for Detection and Characterization of Swine Influenza.** Version 2009. REF. #I-007-05.

DIAGNOSTIC HYBRIDS. **D³@ Ultra 8TM DFA Respiratory Virus Screening & Identification Kit** REF: I-01-110000 For in vitro Diagnostic Use. ©2011. Disponível em: <http://www.quidel.com/sites/default/files/product/documents/PI-312en_D3_Ultra_8_DFA_Respi_I-01-110000_v2011MAY10.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2016.

GRIST, N. R. et al. **Diagnostic Methods in Clinical Virology.** 3. ed. Oxford: Blackwell, 1979. 229 p.

ISAAC-RENTON, J. L. **Pandemic Plan for British Columbia Public Health Microbiology & Reference Laboratory and Networks.** [S.l.]: British Columbia, Sept. 2012.

KISSOVÁ, R. et al. Factors affecting the success of influenza laboratory diagnosis. **Central European Journal of Public Health**, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 164-169, Sept. 2014.

QIAGEN COMPANIES. **QIAamp Viral RNA Mini Kit Handbook 01/99**. (cat. nº. 52904). Disponível em: <<https://www.qiagen.com/br/shop/sample-technologies/rna/rna-preparation/qiaamp-viral-rna-mini-kit/>>. Acesso em: 22 maio 2015.

TONG. S. et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. **PLoS Pathogens**, [S.l.], v. 9, n. 10, p. e1003657, 10 out. 2013. doi:10.1371/journal.ppat.1003657

VIGILANCIA de las Enfermedades Infecciosas en los Países Del Cono Sur - Buenos Aires - Argentina/ 3-9 junio 2000. [Argentina]: s.n., [2000?].

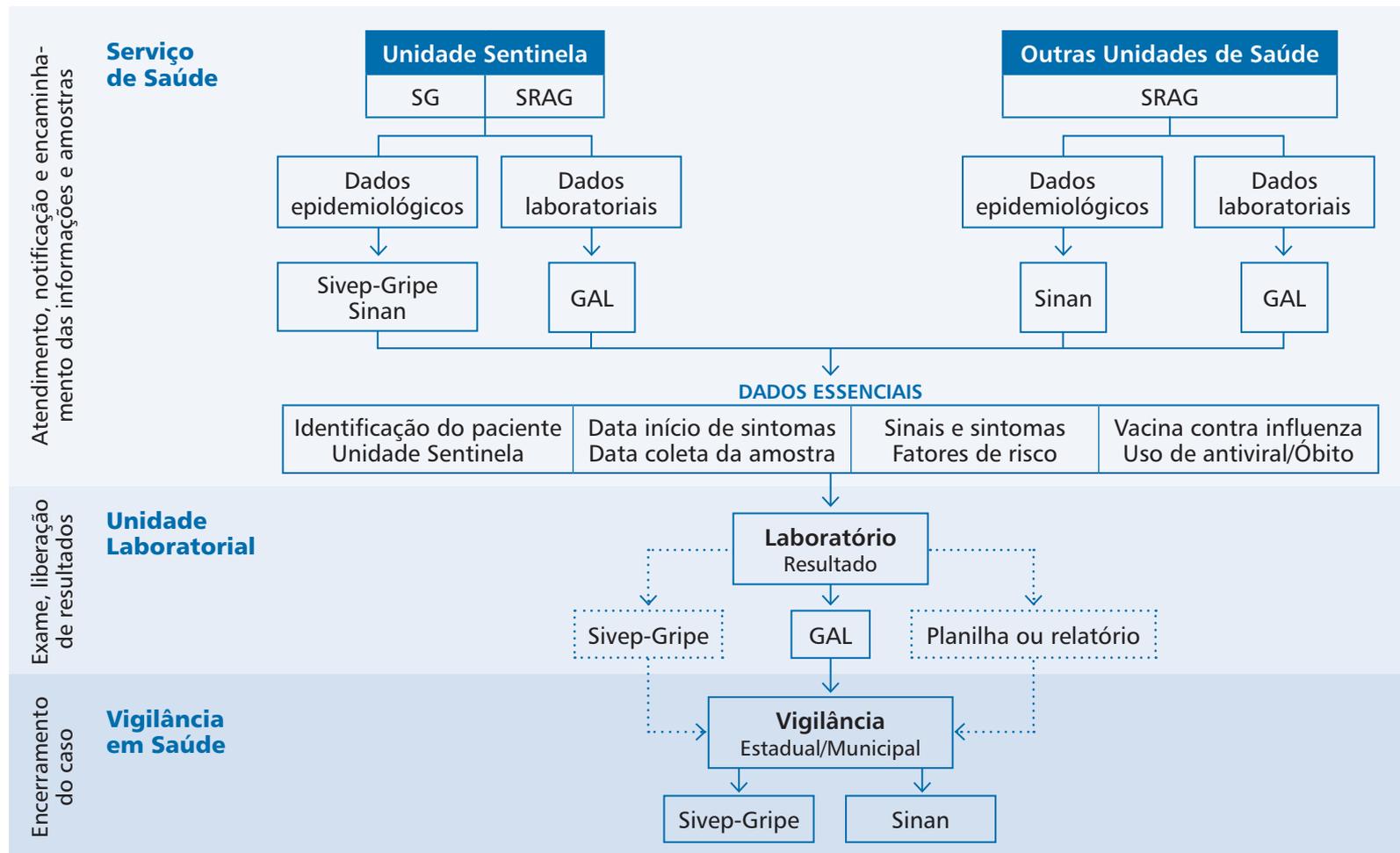
WHO GLOBAL INFLUENZA SURVEILLANCE NETWORK. **Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza**. Geneva: WHO, 2011. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf>. Acesso em: 22 maio 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza**. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/>. Acesso em: 22 maio 2015.

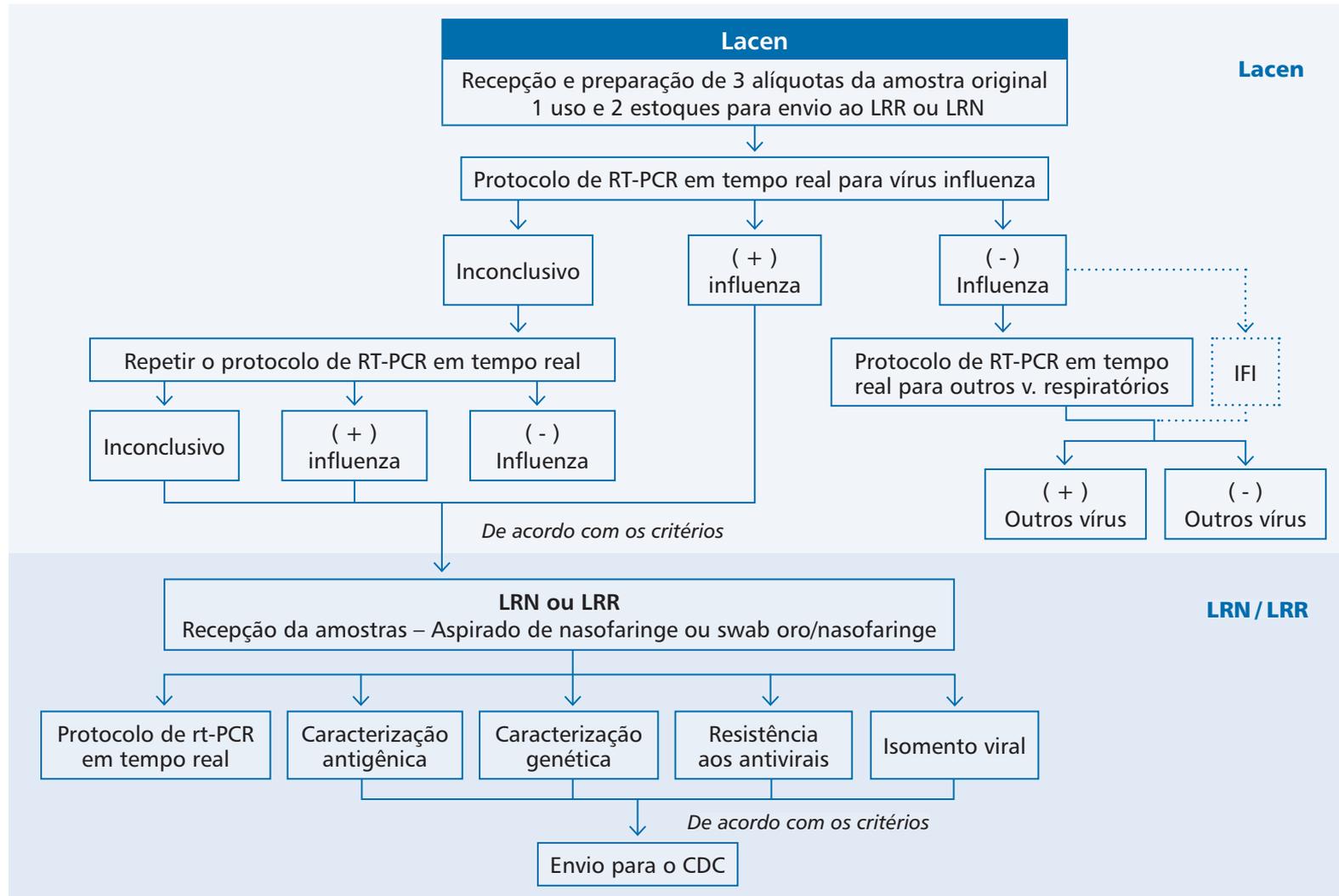
_____. **National Influenza Centres: Region of the Americas of WHO**. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/national_influenza_centres/list/en/index1.html>. Acesso em: 22 maio 2015.

ANEXOS

Anexo A – Fluxograma dos sistemas de informações



Anexo C – Algoritmo de diagnóstico laboratorial para influenza e outros vírus respiratórios



Anexo D – Guia rápido de coleta de amostra

	SWAB DE NASOFARINGE	SWAB DE OROFARINGE	ASPIRADO DE NASOFARINGE
Materiais	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Swab</i> do tipo rayon • Tubo com meio de transporte viral (1 a 3 mL de meio de transporte viral estéril) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Swab</i> do tipo rayon • Tubo com meio de transporte viral (1 a 3 mL de meio de transporte viral estéril) 	<ul style="list-style-type: none"> • Coletores plásticos descartáveis de secreções com volume de 20 ml, acoplado a sonda uretral número seis e meio e controle do vácuo ARGYLE ou Equipo de soro para administração parenteral com sonda plástica uretral nº 6 estéril. • Tubo com meio de transporte viral (1 a 3 mL de meio de transporte viral estéril)
Procedimentos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inclinare a cabeça do paciente. 2. Inserir o <i>swab</i> pela narina até a região posterior do meato nasal. 3. Fazer a coleta friccionando o <i>swab</i>, rodando, tentando obter um pouco das células da mucosa. 4. Colocar no tubo contendo meio de transporte e cortar a parte sobressalente da haste do <i>swab</i>. 5. Colher <i>swab</i> das duas narinas (um <i>swab</i> para cada narina). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inclinare a cabeça do paciente. 2. Inserir o <i>swab</i> pela boca. 3. Fazer a coleta friccionando o <i>swab</i>, na parte posterior da faringe e áreas tonsilares, evitando a língua. 4. Colocar no tubo contendo meio de transporte e cortar a parte sobressalente da haste do <i>swab</i>. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aspirar a secreção de nasofaringe das duas narinas. Utilizar bomba aspiradora portátil ou vácuo de parede; sem pressão de vácuo muito forte. 2. Inserir a sonda através da narina até atingir a região da nasofaringe. 3. Aplicar vácuo, aspirando a secreção. 4. Manter movimentação da sonda para evitar que haja pressão diretamente sobre a mucosa, provocando sangramento. 5. Após aspirar a secreção nasofaríngea com o coletor próprio, aspirar todo meio de transporte viral para dentro do coletor. 6. Fechar o frasco coletor utilizando a tampa plástica que se encontra na parte inferior do coletor. 7. Vedar esta tampa com plástico aderente tipo Parafilm ou esparadrapo.

ACONDICIONAMENTO

- Rotular o tubo contendo as amostras coletadas, observando se a tampa está hermeticamente fechada.
- Não utilizar lápis ou caneta para rotular, pois eles podem se apagar. Utilizar preferencialmente caneta permanente/marcadora.
- Preencher a ficha de notificação de acordo com as orientações da vigilância epidemiológica.

ARMAZENAMENTO

- Os tubos contendo as amostras deverão ser imediatamente colocados em um refrigerador a 4°C e/ou ser mantidos com gelo reciclável até o transporte aos Lacens.

TRANSPORTE

- As condições de transporte devem ser otimizadas para garantir máxima recuperação dos espécimes.
- Os espécimes devem ser transportados a uma temperatura de 4°C (para execução da imunofluorescência indireta) ou congelados a -20°C ou -70°C (para execução do RT-PCR em Tempo Real).
- Para efetuar o transporte das amostras biológicas devem-se obedecer rigorosamente as normas de biossegurança vigentes, segundo as normas de acondicionamento e transporte de substâncias infecciosas da lata.

CONSIDERAÇÕES

- Coletar as amostras de síndrome gripal, preferencialmente, até o sétimo dia após início dos sintomas.
- Para SRAG em UTI e óbitos a coleta deve ser realizada independente do dia de início dos sintomas.

Página intencionalmente branca

LISTA DE CONTATOS

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Grupo Técnico de Influenza (GT-Influenza)

Unidade Técnica de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratórias e Imunopreveníveis (UVRI)

Coordenação-Geral de Doenças Transmissíveis (CGDT)

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)

E-mail: gripe@saude.gov.br

Telefone: (61) 3213-8111 / 3213-8104

LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA NACIONAL

Fiocruz – Rio de Janeiro

Abrangência: AL, BA, ES, MG, PR, RJ, RS, SC, SE

Responsável: Dra. Marilda Siqueira

E-mail: mmsiq@ioc.fiocruz.br

Telefone: (21) 2562-1778

LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA REGIONAL

Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

Abrangência: DF, GO, MT, MS, PI, SP, RO, TO

Responsável: Dra. Terezinha Maria de Paiva

E-mail: tterezinha@uol.com.br

Telefone: (11) 3068-2913

LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA REGIONAL

Instituto Evandro Chagas – Pará

Abrangência: AC, AM, AP, CE, MA, PA, PB, PE, RN, RR

Responsável: Dr. Wyller Mello

Instituto Evandro Chagas

E-mail: wyllermello@iec.pa.gov.br

Telefone: (91) 3214-2013 / 3214-2024

Página intencionalmente branca



Secretaria de Vigilância em Saúde:
www.saude.gov.br/svs

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde:
www.saude.gov.br/bvs

