



PROTOCOLO DE COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

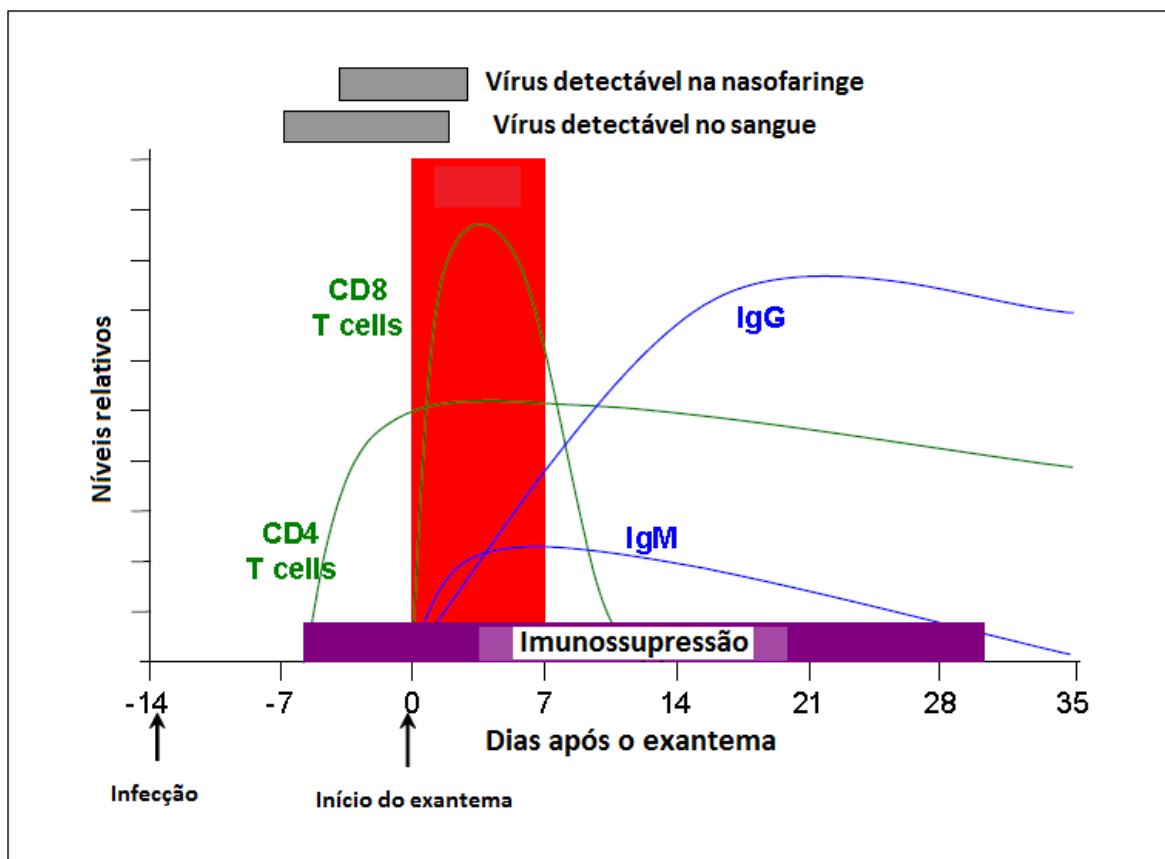
(Atualizado em Abril 2021)

SARAMPO E RUBÉOLA

O diagnóstico laboratorial do sarampo e da rubéola é realizado por meio de **sorologia** para detecção de anticorpos IgM específicos. Para tanto, é imprescindível assegurar, **logo no primeiro atendimento do paciente**, a coleta da amostra do sangue para a sorologia. É necessária, também, a coleta de amostras biológicas para a identificação viral por RT-PCR, a fim de conhecer o genótipo do vírus que está circulando.

Sorologia: Detecção de anticorpos específicos da classe IgM para sarampo e rubéola (Figuras 1 e 2)

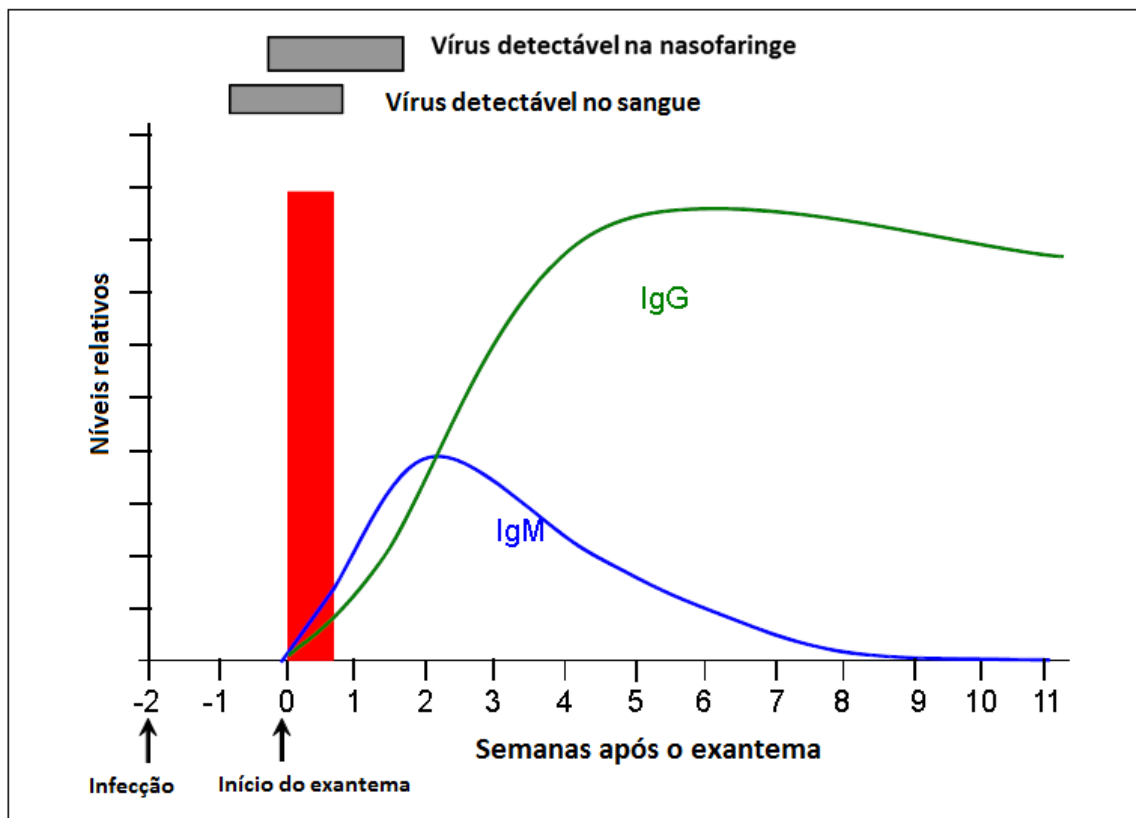
Figura 1. – Resposta imunológica na infecção pelo sarampo



Fonte: WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, second edition. 2007. Disponível em : www.who.int/vaccines-documents



Figura 2. – Resposta imunológica na infecção pela rubéola



Fonte: WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, second edition. 2007. Disponível em : www.who.int/vaccines-documents/

No Estado de São Paulo (ESP) e demais estados do Brasil, a rede de laboratórios de Saúde Pública de Referência para o sarampo e rubéola utiliza a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgM e IgG.

Quando o resultado do IgM for reagente ou indeterminado (para sarampo ou para rubéola) é obrigatória a coleta de segunda amostra para dosagem pareada de anticorpos IgG. São necessárias duas amostras de soro, a primeira na fase aguda da doença e a segunda na fase convalescente (15 a 25 dias após a primeira coleta). O resultado só será válido, indicando infecção recente, se houver “viragem” sorológica, isto é, 1ª amostra IgG não reagente e 2ª amostra IgG reagente, ou quando a 2ª amostra apresentar aumento expressivo do valor da unidade de referência.

A amostra de sangue do caso suspeito deve ser coletada, sempre que possível, **no primeiro atendimento do paciente**. São consideradas oportunas as amostras coletadas **do 1º até o 30º dia** do aparecimento do exantema. Já as amostras coletadas após o 30º dia são consideradas tardias, mas devem, mesmo assim, ser aproveitadas e encaminhadas ao laboratório para realização da pesquisa de IgM.



Tipo de material e quantidade

O material a ser colhido é o **sangue venoso** na quantidade **de 5 a 10 ml**.

Quando se tratar de **criança muito pequena** e não for possível coletar o volume estabelecido, colher **3 ml**, no mínimo.

Técnica de coleta - sorologia

O sangue venoso deve ser colhido de forma asséptica em tubo de vácuo (vacutainer), seco, sem anticoagulante, com capacidade para 10 ml.

Na falta do tubo de vácuo colher o sangue com seringa de 10 ml e agulha descartável. Após a coleta, transferir o sangue para um tubo de ensaio esterilizado, seco e sem anticoagulante, retirando a agulha e escorrendo o líquido lentamente pelas paredes desse tubo, a seguir fechar hermeticamente (vedando bem) com tampa estéril.

Separação do soro

O procedimento para separação do soro é diferente para os serviços de saúde que têm centrífuga e para os que não dispõem desse equipamento:

- Em serviços que dispõem de centrífuga:

- deixar o sangue à temperatura ambiente por 1 hora para retração do coágulo;
- após a retração do coágulo, separar o soro utilizando uma centrífuga;
- centrifugar o **sangue** no próprio tubo, com tampa, a 1.500 rpm (rotações por minuto), por cinco minutos;
- transferir o soro (sobrenadante) para **um flaconete estéril e seco, fechá-lo com tampa de rosca;**
- **identificar o flaconete com o nome do paciente, sexo, idade, e data da coleta.**

- Em serviços que **não** dispõem de centrífuga:

- deixar o sangue em repouso no próprio tubo da coleta, em temperatura ambiente, entre uma e duas horas, para que ocorra a retração do coágulo;
- quando a amostra for colhida no período da manhã retirar o coágulo à tarde;
- quando a amostra for colhida no período da tarde retirar o coágulo na manhã seguinte;
- para sangue coletado em tubo de vácuo, separar o soro deixando o tubo de vácuo invertido (com a rolha para baixo), em repouso por duas horas;
- remover o coágulo que está aderido à rolha, inclinando o tubo de forma que a tampa fique mais alta que o fundo (quando não aderir usar um palito de madeira, estéril, para retirar o coágulo - desprezar o palito em recipiente com desinfetante);
- fechar o tubo, após a retirada do coágulo, colocando-o na geladeira, desta vez com a rolha para cima, até que a parte "vermelha" restante fique depositada no fundo do tubo;
- **identificar o tubo com o nome do paciente, sexo, idade e data da coleta.**



- deixar acondicionado à temperatura de +4°C, no máximo por 48 horas.

Conservação

Como descrito acima, após a separação, conservar o tubo com o soro sob refrigeração, na temperatura de +4°C, por no máximo, 48 horas.

Enviar ao laboratório no prazo de dois dias, no máximo, colocando o tubo em embalagem térmica ou caixa de isopor, com gelo ou gelo reciclável (*gelox*).

Caso o soro não possa ser encaminhado ao laboratório no prazo de dois dias (48h), retirar o sobrenadante com uma pipeta Pasteur estéril (deixando a parte “vermelha” restante no fundo do tubo). Congelar o soro à - 20°C (freezer) até o momento do transporte para o laboratório de referência.

Encaminhamento da amostra do soro

Para encaminhar a amostra do soro ao laboratório proceder da seguinte forma:

- ⇒ **Verificar se a Ficha de Encaminhamento de Amostra (contendo o nº do SINAN) está correta e completamente preenchida (com identificação do paciente, idade, dados de suspeita, primeiros sintomas, data de coleta e de vacina tríplice viral) e legível (Figura 3).**

Figura 3. Ficha de notificação e de solicitação de exames (Sinan)

REPUBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA SAÚDE
ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

SINAN
SISTEMA NACIONAL DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO
FICHA DE SOLICITAÇÃO DE EXAMES

Nº

Requirente	1 Laboratório	Código	2 Data de Entrada
	3 Município de Notificação		Código IBGE
	4 Unidade de Saúde		Código (SIA/SUS)
	5 Endereço		6 (DDD) Telefone
Paciente/Exames	7 Nome do Paciente		8 Número do Cartão SUS
	9 Data de Nascimento	10 (ou) Idade	11 Sexo
		D - dias M - meses A - anos	M - Masculino F - Feminino I - Ignorado
	12 Suspeita Clínica		
	13 Caso 1-Suspeito 2-Comunicante 9-Ignorado	14 Data dos Primeiros Sintomas	15 Exame
	16 Material Enviado	17 Data da Coleta	18 Uso de Antibiótico na Data da Coleta
			1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado
19 Gestante	20 Paciente tomou vacina?	21 Requirente	
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ignorado	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não se sim, especificar: Data	22 Data	

NOTIFICAÇÃO_NUMERADA_51 12/972005 MR COREL (CENEPI 02.24 04/10/00) Obs: O material para exame só será aceito quando preenchidos os itens 1 e 10. Quando se tratar de comunicante não preencher o item 14.

Atenção:

As solicitações de exames, nunca devem ser colocadas dentro do isopor junto com os frascos, isso as danificariam impedindo posterior identificação.

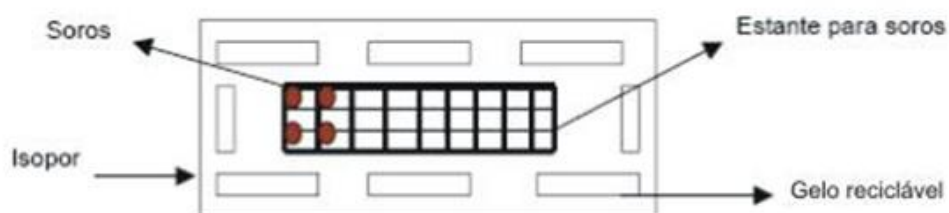
- verificar se o tubo ou **FLACONETE** com a amostra contém a identificação do paciente e da Unidade de Saúde;
- **fazer o cadastro da amostra do caso suspeito no sistema GAL (Gerenciamento de Amostra Laboratorial), solicitando o exame específico para o agravo suspeito;**
- verificar se os dados da Ficha de Encaminhamento de Amostra correspondem



aos dados de identificação registrados no frasco, a fim de evitar a troca do material;

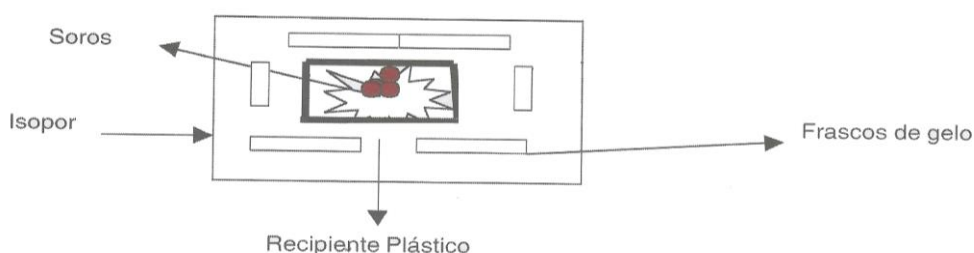
- acondicionar o tubo ou **flaconete**, individualmente em sacos plásticos, em estante para evitar a quebra do material e, depois, colocá-los dentro de um isopor com gelo reciclável, conforme esquema apresentado na Figura 4 abaixo;

Figura 4. Acondicionamento das amostras de soro em estantes para envio ao laboratório.



- quando não houver estante disponível pôr os **tubos ou flaconetes** com as amostras acondicionadas em saco plástico, individualmente, colocando-o, em seguida, dentro de um isopor ou recipiente menor, protegendo com folhas de papel ou flocos de isopor (o isopor ou recipiente menor exerce a mesma função da estante) e depois no isopor maior, conforme esquema apresentado na Figura 5.

Figura 5. Acondicionamento das amostras em recipiente plástico para envio ao laboratório.



Ao lidar com as amostras de soro, inclusive quando do encaminhamento ao laboratório, devem ser adotados os seguintes cuidados:

1. todo soro deve ser **enviado imediatamente** ao laboratório;
2. nenhum soro deve ser estocado no local da coleta do sangue;
3. todo soro deve ser processado logo que chegue ao laboratório de referência;
4. o intervalo entre o recebimento do soro pelo laboratório de referência e a liberação do resultado deve ser de **4 dias**;
5. **todo soro cujo resultado no teste (ELISA) for IgM reagente ou indeterminado para sarampo ou rubéola deve ter uma segunda coleta de sangue feita 15 dias após primeira para dosagem de IgM e pareamento do IgG.**

Nota: Quando a sorologia para sarampo e/ou rubéola foi realizada em laboratório diferente do IAL, isto é, em laboratório que não seja o de referência, e



o resultado foi reagente ou indeterminado, **esta amostra deverá ser recuperada** (alíquota) e enviada ao **IAL** para análise. Caso não seja possível o resgate da amostra, providenciar outra, de preferência, dentro do intervalo considerado oportuno (1º ao 30º dia do exantema).

Casos com resultados IgM negativos são descartados. Nesta circunstância uma segunda amostra poderá ser solicitada quando o laboratório de referência ou a DDTR/CVE julgarem necessário.

Podem ocorrer resultados de **IgM reagentes** que, após a investigação clínica, epidemiológica e laboratorial adequadas evidenciam a possibilidade de ser um resultado **falso positivo**. Nestes casos, **deve ser solicitada uma segunda amostra** para que sejam novamente analisados, classificados com posterior realização de sorologia **para diagnóstico diferencial para** outras doenças exantemáticas: Exantema súbito (Herpesvírus 6), Eritema infeccioso (Parvovírus B19), Dengue, Chikungunya e Zika.

RT-PCR para identificação do vírus do sarampo e da rubéola

Os vírus do sarampo e da rubéola, podem ser identificados nas seguintes amostras biológicas: sangue total, secreção nasofaríngea, urina, saliva e, em casos de encefalite, líquido (líquido céfalo-raquidiano-LCR).

A norma nacional vigente preconiza o RT-PCR nas seguintes amostras biológicas: **urina e secreção nasofaríngea**.

As chances para o identificação viral são maiores quando a coleta ocorre nos primeiros dias de exantema, o transporte da amostra biológica é adequado e o envio ao laboratório de referência é rápido.

Considerando a **eliminação do Sarampo**, da Rubéola e da Síndrome da Rubéola Congênita, a RT-PCR tem por objetivos:

- identificar o genótipo do vírus de cada cadeia de transmissão;
- diferenciar os casos autóctones de sarampo dos casos importados;
- diferenciar o vírus selvagem do vírus vacinal.

Crítérios para a coleta de material biológico para identificação viral por RT-PCR

Considerando a situação epidemiológica e no contexto da eliminação do vírus a coleta das amostras biológicas (swabs combinados de naso e orofarínge e urina), deve ser realizada em todos os casos, especialmente em indivíduos não vacinados, internados, principalmente crianças menores de 1 ano de idade e adultos com história de viagem .

Período para coleta das amostras biológicas.

As amostras biológicas (swabs combinados de naso e orofarínge e urina) devem ser coletadas **até o 7º dia** a partir do início do exantema, preferencialmente nos primeiros cinco dias.



Quantidade, encaminhamento e processamento do swab combinado de naso e orofaringe

- Introduzir um swab na cavidade nasal direita, outro na cavidade nasal esquerda e outro na nasofaringe, deslizar suavemente para coleta da amostra;
- colocar os 3 swabs em um único tubo contendo solução salina no volume de 1ml para cada swab, acondicionados em caixa de isopor com gelo reciclável.
- **fazer um único cadastro dessas amostras no sistema GAL (Gerenciamento de Amostra Laboratorial), solicitando o exame específico para o agravo suspeito;**
- Enviar ao Laboratório de Referência dentro de 6 horas; não congelar.
- Em caso de dúvidas, seguir orientações no vídeo:
<http://www.ial.sp.gov.br/ial/perfil/homepage/aceso-rapido/covid-19-videos-de-orientacao-para-coleta-e-transporte-de-amostras-e-cadastro-de-exames>.

Quantidade, encaminhamento e processamento da urina

- coletar de 15 a 100 ml de urina, em frasco novo e estéril;
- coletar, de preferência, a primeira urina da manhã, após higiene íntima, desprezando o primeiro jato e coletando o jato médio; não sendo possível obter a primeira urina do dia, colher em outra hora;
- logo após a coleta, colocar o frasco com a urina em caixa de isopor com gelo reciclável e enviar ao IAL-SP, dentro de 6 horas, no máximo, para evitar que o crescimento de bactérias diminua a possibilidade de identificação do vírus; a urina não deve ser congelada na unidade;
- a amostra assim que chegar ao laboratório de referência será submetida aos procedimentos específicos para o congelamento.

PANENCEFALITE ESCLEROSANTE SUBAGUDA (PEESA)

As amostras priorizadas pelo IAL/SP para o Diagnóstico de Panencefalite Esclerosante Subaguda (pós sarampo ou rubéola) para a RT - PCR e pesquisa de anticorpos da classe IgM e IgG são sangue e LCR

- coletar 10 ml de sangue venoso em tubo de vácuo (vacutainer) seco, **sem anticoagulante.**
- Seguir o mesmo procedimento para separação e encaminhamento de soro.
- coletar 10 ml de LCR **em frasco seco e estéril, fechar bem, identificar e transportar em caixa de isopor com gelo reciclável** para o IAL-SP, dentro de 6 horas.
- A amostra de líquido não deverá ser manipulada para qualquer outro tipo procedimento e caso não seja enviada imediatamente, deverá ser mantida congelada.

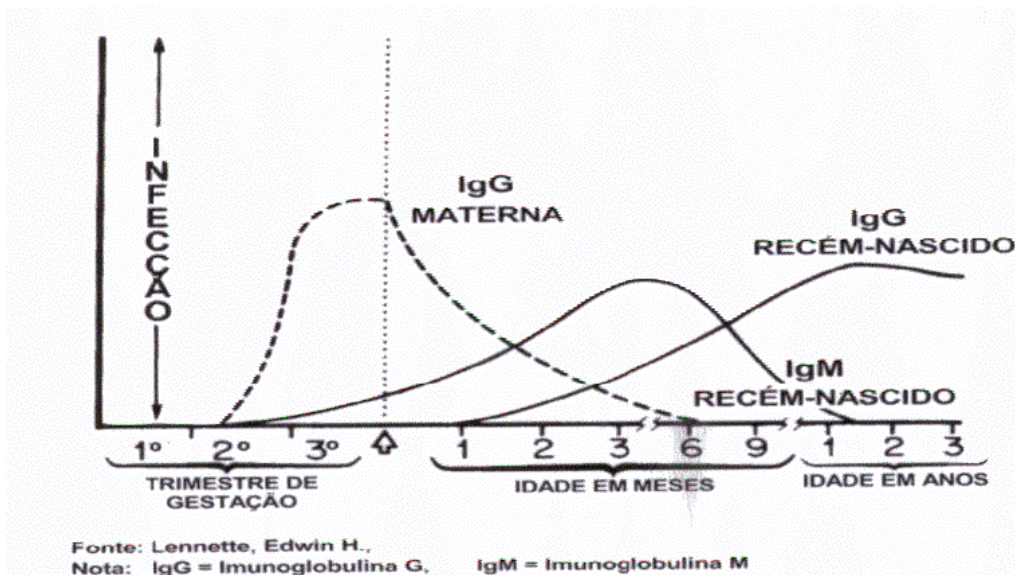


SÍNDROME DA RUBÉOLA CONGÊNITA (SRC)

Os exames laboratoriais (sorologia e RT-PCR) são imprescindíveis para o estabelecimento do diagnóstico diferencial definitivo.

Para a investigação de casos suspeitos de SRC devem ser coletadas amostras de sangue para pesquisa da presença de IgM para rubéola ou elevação persistente de IgG específico para rubéola em amostras pareadas (ao nascimento, aos 3 e 6 meses de vida). A Figura 6 abaixo ilustra a resposta imune na SRC.

Figura 6. Resposta imune na síndrome da rubéola congênita.



A **RT-PCR** é de grande importância na confirmação da rubéola congênita, particularmente nos casos de abortamento e, principalmente, no acompanhamento dos casos de SRC, para a determinação do tempo de eliminação do vírus, isto é, com o objetivo de avaliar o período de transmissibilidade. A primeira coleta deve ser realizada ao nascer e a segunda aos 03 meses de vida, sendo monitorada a cada 03 meses até o vírus da rubéola não ser mais detectado.

As amostras biológicas priorizadas para a pesquisa do vírus da rubéola são: soro, urina e swab de naso-orofaringe.

Crítérios para Coleta das Amostras Biológicas

Quantidade, encaminhamento e processamento do swab combinado de naso e orofaringe

- Introduzir um swab na cavidade nasal direita, outro na cavidade nasal esquerda e outro na nasofaringe, deslizar suavemente para coleta da amostra;
- colocar os 3 swabs em um único tubo contendo solução salina no volume de



- 1ml para cada swab, acondicionados em caixa de isopor com gelo reciclável
- Enviar ao Laboratório de Referência dentro de 6 horas; não congelar.

Quantidade, encaminhamento e processamento da urina

- coletar de **15 a 100 ml de urina, em frasco novo, seco e estéril;**
- coletar, de preferência, a primeira urina da manhã após higiene íntima, desprezando o primeiro jato e coletando o jato médio; não sendo possível obter a primeira urina do dia, colher em outra hora, quando a urina estiver retida de 2 a 4 horas;
- **logo após a coleta, colocar o frasco com a urina em caixa de isopor com gelo reciclável** e enviar ao IAL-SP, dentro de 6 horas, no máximo, para evitar que o crescimento de bactérias diminua a possibilidade de isolamento do vírus; **a urina não deve ser congelada na unidade.**

Em caso de **ABORTAMENTO** ou natimorto resultante de gestação durante a qual se suspeitou ou se comprovou a ocorrência de rubéola materna, amostras da autópsia de pulmão, fígado, cérebro e placenta, devem ser coletadas e colocadas imediatamente em tubos estéreis contendo solução salina estéril, transportadas em caixa de isopor com gelo reciclável e enviadas ao IAL, dentro de 6 horas.

Recém-nascido cuja mãe teve suspeita ou diagnóstico confirmado de rubéola durante a gestação ou lactente avaliado como caso suspeito de SRC

- Amostra coletada **logo após o nascimento ou a suspeita clínica de SRC:**
- Coletar uma **segunda amostra após três meses.**
- Coletar **3ª amostra após 3 meses**, para confirmação ou descarte do caso; Persistência de IgG além de 6 – 12 meses, principalmente em altos níveis, é altamente sugestivo de rubéola congênita.
- Os critérios diagnósticos utilizados para confirmação e descarte são apresentados nos fluxogramas específicos do Guia de Vigilância em Saúde, 1ª. Edição, 2019, SVS/MS/Brasil.

ATENÇÃO:

No caso da **gestante sintomática** cujo resultado do exame foi IgM reagente, o laboratório (público ou particular) deve notificar esta ocorrência à vigilância epidemiológica estadual/municipal, conforme fluxo estabelecido, mediante o envio da cópia do resultado do exame e resgate de alíquota para retestagem no IAL. Essa gestante deve ser acompanhada até o parto e avaliação do concepto.



PARVOVIROSE

A investigação laboratorial deverá ser solicitada ao Instituto Adolfo Lutz, através da equipe de vigilância (Grupo de Vigilância Epidemiológica/DDTR/CVE) na **ocorrência de surtos**, pois este exame não faz parte da rotina do diagnóstico laboratorial.

As orientações de coleta sanguínea para sorologia e RT-PCR e o transporte adequados, são as mesmas descritas para diagnóstico de sarampo e rubéola.

O número de amostras de um mesmo surto será uma amostragem do número total de casos ocorrido na área geográfica, por exemplo:

a - até 10 casos: testar todas as amostras.

b - 11 a 30 casos: testar 50% das amostras.

c - 31 a 49 casos: testar 25% das amostras

d - > ou = a 50 casos selecionados: testar 20% das amostras (garantir no mínimo realização de 10 amostras testadas por bairro).

Os outros casos serão confirmados (ou descartados) por vínculo epidemiológico.

A técnica para coleta, armazenamento e transporte são as mesmas descritas para sorologia de sarampo e rubéola, assim como para processamento de PCR.

Texto atualizado em Abril, 2021, por:

Dra. Ana Lúcia Frugis Yu

Dra. Juliana Akemi Guinoza

GT-Exantemáticas/DDTR/CVE

PqC. Ana Maria Sardinha Afonso

Dra. Fabiana Cristina Pereira dos Santos

Núcleo de Doenças Respiratórias/Centro de Virologia/IAL/CCD/SES-SP

<http://www.ial.sp.gov.br/ial/servicos/exames-amostras-biologicas>

Original:

GUIA DE VIGILÂNCIA PARA ERRADICAÇÃO DO SARAMPO, CONTROLE DA RUBÉOLA E DA SÍNDROME DA RUBÉOLA CONGÊNITA/SP/2002

www.cve.saude.sp.gov.br

www.ial.sp.gov.br