

NOTA INFORMATIVA Nº 03/2021 – LACEN/DVS/SESPA

Assunto: INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DO CORONAVÍRUS 2019

Data da Atualização: 05/04/2021

Este documento tem por objetivo atualizar os procedimentos técnicos a serem realizados nos locais de coleta de amostras para diagnóstico de casos suspeitos da COVID-19, que serão examinadas por Biologia Molecular pela metodologia RT-qPCR, através da padronização de métodos de coleta, prazos para coleta, insumos utilizados, acondicionamento, transporte e envio ao LACEN-PA, a fim de garantir a qualidade das amostras biológicas.

1. SOBRE O EXAME RT-qPCR

Desde o início da epidemia de COVID-19, a OMS recomenda que o diagnóstico laboratorial seja realizado utilizando testes moleculares, que visam a detecção do RNA do SARS-CoV-2 em amostras do trato respiratório por RT-PCR em tempo real (reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa – RT-qPCR). Até o momento, este permanece sendo o teste laboratorial de escolha para o diagnóstico em pacientes na fase aguda da doença.

2. INDICAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRAS

A realização de coleta de amostra respiratória está indicada sempre que o indivíduo atender a definição de:

- Caso suspeito de COVID-19: com Síndrome Respiratória Aguda Grave - SRAG e suspeitos de Síndrome Gripal (SG), em serviços de saúde públicos e privados, com solicitação médica.
- Assintomáticos ou Contatos de Casos Confirmados: assintomáticos, **prioritariamente para os profissionais da saúde e segurança pública**, com periodicidade a ser definida por cada serviço, conforme acordo prévio com este LACEN-PA por instituições responsáveis, e contatos de casos confirmados, para identificar casos assintomáticos em fase virêmica e evitar a transmissibilidade da doença.



3. OPORTUNIDADES DE COLETA PARA DIAGNÓSTICO

- Caso suspeito de Síndrome Gripal: coleta da amostra recomendada entre **1º e o 8º** dia de início dos sintomas (fase aguda da doença), por meio de *swab* de nasofaringe.
- Caso de Síndrome Respiratória Aguda Grave: coleta da amostra pode ser realizada entre o **1º e o 14º** dia do início dos sintomas através da secreção de nasofaringe. Nos casos graves também podem ser coletadas amostras do trato respiratório inferior como escarro, aspirado traqueal e lavado broncoalveolar.
- Assintomáticos: realizar a coleta do *swab* no período mínimo de **5 dias** após o último encontro com o caso suspeito e/ou confirmado de covid-19, considerando o período de incubação médio de 5 a 6 dias, e ao coletar no quinto (5º) dia, espera-se que tenha terminado o período de latência médio e o contato, se contaminado, já esteja eliminando o vírus, aumentando a chance real de se detectar o RNA viral em pessoas assintomáticas.

Após os períodos indicados, a sensibilidade de metodologia diminui e desta forma não é recomendável a coleta fora desses períodos, exceto em casos de critério médico.

4. INSUMOS FORNECIDOS PELO LACEN-PA PARA COLETA

O LACEN-PA disponibiliza insumos aos estabelecimentos da Rede Pública de Saúde que solicitam materiais destinados a coleta de amostras para detecção de SARS-CoV-2. A solicitação dos mesmos deve ser realizada por ofício físico endereçado a direção do Laboratório, assinado pelo secretário de saúde ou pela direção do Centro Regional de Saúde, podendo ser escaneado e enviado através de e-mail: direcao.lacen@lacen.pa.gov.br. A retirada dos insumos deverá ser feita com prazo mínimo de 48 horas após envio da solicitação, na secretaria da direção, de segunda a sexta-feira, de 08:00 h as 18:00 h, apresentando cópia do documento de solicitação.

Os insumos disponibilizados são Swab de Rayon e Meio de Transporte Viral.

• SWAB ESTÉRIL COM HASTE PLÁSTICA E PONTA DE RAYON

Devido à escassez mundial de insumos relacionados à assistência e ao diagnóstico laboratorial de COVID-19, a Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS) autoriza a utilização de **apenas um SWAB** por paciente, para as duas narinas (NOTA TÉCNICA Nº 34/2020-CGLAB/DAEVS/ SVS/MS). O swab deve ser colocado no tubo com meio de transporte viral, formando uma **única** amostra por paciente.



Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para coleta de amostras de trato respiratório superior devem ser utilizados *swabs* de fibra sintética (rayon) com haste de plástico. Não devem ser usados *swabs* de alginato de cálcio ou com hastes de madeira, pois podem conter substâncias que inativam alguns vírus e inibem o teste de PCR.

Nota: Observa-se que, na falta de Swabs ofertados pelo LACEN-PA, a aquisição deste insumo é responsabilidade do Município e/ou Instituição de Saúde.

• **O meio de transporte viral disponível pode ser nos formatos abaixo:**

1. Solução Salina Equilibrada de Hank (*Hank's Balanced Salt Solution*) - meio de Hanks deve ser armazenado em temperatura de -20°C (freezer ou congelador). Imediatamente antes da coleta, o meio de Hanks deve ser retirado do freezer ou congelador para descongelamento, com o cuidado de manter a temperatura de refrigeração (2° C a 8° C). Após a coleta, manter refrigerado até entrega no LACEN.
2. VTM (Meio de Transporte Viral) – LABORCLIN- deve ser armazenado em temperatura de refrigeração (2° C a 8° C), com o cuidado de manter a temperatura de refrigeração (2° C a 8° C) após a coleta, durante o transporte e manter refrigerado até entrega no LACEN.

Observação₁: os tubos com Meio de Transporte Viral com amostras, recebidos por este LACEN, devem ser os mesmos que foram fornecidos para a realização de coleta, padronizado por este LACEN, sendo vetado uso de outros tubos ou coletores.

Observação₂: os tubos com Meio de Transporte Viral fornecidos pelo LACEN não podem ser manipulados para aliquotagem, fracionamento, acréscimo ou retirada de conteúdo, devido a não garantia da esterilidade do tubo e uso de volume inadequado de meio para cada amostra coletada, o que inviabiliza o processamento das amostras.

É imperativo a conservação adequada dos meios de transporte viral e seu adequado uso, pois qualquer alteração na cor do meio, volume e/ou presença de sobrenadantes inviabilizam a utilização dos mesmos.

5. BIOSSEGURANÇA PARA COLETA DA AMOSTRA

O profissional de saúde responsável pela coleta de amostras respiratórias deverá cumprir os critérios técnico-sanitários vigentes bem com o protocolo de biossegurança adotado em sua



instituição. Constitui a primeira linha de proteção, os equipamentos de proteção individual (EPI):

- Gorro descartável;
- Óculos de proteção ou protetor facial total;
- Máscara do tipo PFF2 (N95 ou equivalente);
- Luva de procedimento;
- Avental de mangas compridas; e
- Calçados fechados.

Todos os procedimentos técnicos devem ser realizados de modo a minimizar a geração de aerossóis e gotículas. É imprescindível a troca de luvas a cada coleta, sendo obrigatório o uso de um par de luvas para cada paciente. O fornecimento dos EPI's é de responsabilidade das instituições de saúde.

6. TÉCNICAS PARA COLETA

O processo de coleta é um dos pontos críticos para o resultado do exame. Uma coleta inadequada, com uso do *swab* na porção mais externa da cavidade nasal ou na língua, leva a obtenção de baixo ou nenhum material viral, que não será detectado mesmo por métodos tão sensíveis como métodos moleculares.

A amostra clínica preconizada para realização do RT-qPCR é a secreção de nasofaringe.

Contudo, também podem ser coletadas amostras do trato respiratório inferior como escarro, aspirado traqueal e lavado broncoalveolar em pacientes hospitalizados. Nos casos graves as amostras de trato respiratório inferior podem ter uma positividade maior e permanecer positivas por mais tempo.

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. Inserir com rotação suave o *swab* em uma narina, **paralelamente ao palato e assoalho nasal** até encontrar uma resistência que corresponde a parede posterior da **nasofaringe**. Após atingir a **nasofaringe**, realizar alguns movimentos suaves de fricção e rotação. Deixar o *swab* **imóvel** por 10 segundos na **nasofaringe**, para absorver o máximo de secreção. Retirar devagar, fazendo movimentos suaves de rotação. Repita o procedimento na outra narina utilizando o mesmo *swab* (Figura 1).



Figura 1-Ilustração da Técnica de Coleta secreção de Nasofaringe

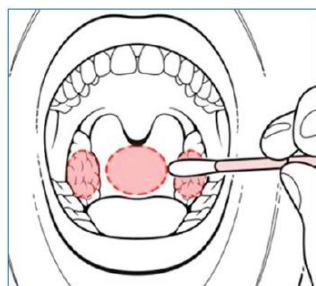


Fonte: BRASIL, 2021

SWAB DE OROFARINGE

A coleta de orofaringe só deve ser realizada quando não for possível a coleta na nasofaringe, por obstrução, outros. A coleta deve ser realizada com a fricção do swab na **parede posterior da faringe e regiões amigdalíneas direita e esquerda**, evitando contato da ponta do swab com a língua, dentes e gengivas (Figura 2).

Figura 2-Ilustração da Técnica de Coleta secreção de Orofaringe



Fonte: BRASIL, 2021

Além das demais técnicas acima, pode também ser realizada a coleta da Amostra de Aspirado Nasofaríngeo (ANF) (Figura 3).

Figura 3- Ilustração da técnica para a coleta de aspirado nasofaríngeo



Fonte: BRASIL, 2021.

LAVADO BRONCOALVEOLAR

Em pacientes hospitalizados o MS recomenda a coleta de lavado broncoalveolar como amostra preferencial ao *swab*. O processo de coleta dessa amostra é menos passível de erros que a coleta de *swabs* favorecendo assim, resultados com maior acurácia para RT-qPCR. Por se tratar de procedimento delicado, que requer utilização de equipamentos específicos, a coleta deve ser realizada por médicos e outros profissionais da saúde devidamente treinados e qualificados.

SALIVA

A Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS) recomenda que, em **caráter excepcional**, em locais onde haja falta de *swabs*, seja feita a coleta de saliva, como alternativa para o diagnóstico da COVID-19.

7. ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

Segundo recomendações da OMS, as amostras para diagnóstico molecular (tanto de trato respiratório superior quanto inferior) devem ser mantidas refrigeradas (2-8°C) até o a entrega no LACEN-PA para processamento, que não deve ultrapassar 72 horas após a coleta. Na impossibilidade de processamento dentro desse período, recomenda-se congelar as amostras a -70°C. Caso haja necessidade de transporte das amostras deve-se assegurar a manutenção da temperatura. É importante evitar o congelamento e descongelamento sucessivos da amostra.

A embalagem para o transporte de amostras deve seguir os regulamentos de remessa para Substância Biológica UN 3373, Categoria B e transportada da seguinte forma:

Primeira embalagem: Frasco com a amostra coletada.

Segunda embalagem: Saco plástico (popular saco de chopp).

Terceira embalagem: Pote plástico.

Quarta embalagem: Caixa térmica com gelo reciclável em quantidade suficiente para manter a amostra refrigerada até a entrega ao LACEN-PA.

IMPORTANTE: A caixa térmica com as amostras para pesquisa de SARS-CoV-2 é de uso **EXCLUSIVO**. Não devem ser enviadas amostras de outros agravos, na caixa térmica, juntos as amostras. Utilizar meios para manter na posição vertical, organizados dentro das caixas, como grades/prateleiras, evitando perda ou derramamento do material, por tombamento.



A entrega das amostras deve ser realizada na Seção de Gerenciamento de Amostras-SGA/DBM/LACEN-PA, todos os dias da semana, no horário de 07:00 às 18:00 h.

8. DOCUMENTOS

Todas as amostras coletadas para realização da metodologia de biologia molecular para o diagnóstico do novo Coronavírus (SARS-CoV-2) devem ser encaminhadas ao LACEN-PA acompanhadas de **Ficha de Notificação e Ficha de Cadastro no GAL**, descritos a seguir:

a. Formulário de Notificação, que pode ser:

- Cópia da Ficha de Investigação de SG suspeito de doença pelo Coronavírus 2019 – COVID-19 (B34.2), atualizado em 04/03/2021 (https://datasus.saude.gov.br/wp-content/uploads/2021/03/Ficha-COVID-04_03_21.pdf), preenchida e gerada no **sistema e-SUS Notifica**, endereço <https://notifica.saude.gov.br/login> para amostras de Casos de Síndrome Gripal – SG, **OU**;
- Cópia do Formulário de Notificação por meio do Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Gripe (SIVEP-Gripe), atualizada em 23/03/2021, preenchida e gerada no **Sivep-Gripe**, endereço <https://sivepgripe.saude.gov.br/sivepgripe/> para amostras de Casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) hospitalizados e óbitos por SRAG, independente de hospitalização **E**;

b. Ficha de Cadastro no GAL - Todas as amostras, **obrigatoriamente**, devem ser cadastradas e encaminhadas na rede do Sistema GAL.

As amostras para Histopatologia deverão vir acompanhadas da ficha de notificação, da ficha de cadastro do GAL, e de um ofício da instituição direcionado ao Laboratório de Virologia I/DBM/ Lacen-Pa, informando: o nome do paciente, o tipo de material coletado e o objetivo para qual a amostra foi coletada.

Obs: as amostras para Histopatologia, relacionadas a COVID-19, serão encaminhadas pelo Lacen-Pa ao laboratório de Referência Nacional.

9. SITUAÇÃO DE ÓBITO

Para pacientes que evoluíram a óbito poderá ser realizada a coleta das seguintes amostras para o diagnóstico viral e histopatológico:



9.1- Coleta da amostra de nasofaringe (SWAB):

A coleta da amostra de nasofaringe (SWAB) deve ser realizada no estabelecimento de saúde/municípios onde ocorreu o óbito (pós morte), apenas em locais onde é viável a realização de técnicas de coleta de amostra post-mortem. O tempo entre o óbito e a coleta da amostra deve ser o menor possível, devendo não ultrapassar **12 horas**, e ser encaminhada imediatamente ao LACEN-PA.

Os estabelecimentos de saúde devem garantir a coleta da amostra de secreção da nasofaringe (SWAB) conforme as normativas do Ministério da Saúde.

9.2- Coleta de amostras para o diagnóstico viral e histopatológico (coleta realizada por médico):

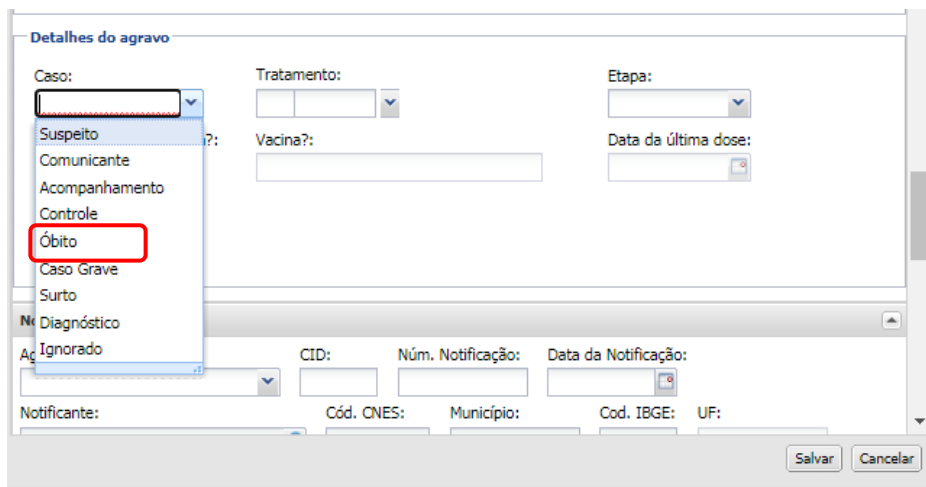
- Tecido da região central dos brônquios (hilar), dos brônquios direito e esquerdo e da traqueia proximal e distal;
- Tecido do parênquima pulmonar direito e esquerdo;
- Tecido das tonsilas e mucosa nasal.

Para o diagnóstico viral, as amostras frescas coletadas 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 o diagnóstico histopatológico, a coleta de amostras deve ser feita observando-se os protocolos em vigência, nos serviços locais de patologia. Acondicionar as amostras em frasco de polipropileno, ou potes de plástico com boca larga com formalina tamponada a 10%. Utilizar parafina sem compostos adicionais (por exemplo: cera de abelha, cera de carnaúba, dentre outros) no processo de parafinização dos fragmentos.

É obrigatório que seja informado na Ficha de Notificação e na Ficha de Cadastro no GAL que se trata de óbito (nos campos detalhes do agravo e em observação) e o tempo de coleta após o óbito.





10. RESULTADOS LABORATORIAIS

Conforme a Portaria Nº 1.792, de 17 de julho de 2020, que altera a Portaria nº 356/GM/MS, de 11 de março de 2020, e dispõe sobre a obrigatoriedade de notificação ao Ministério da Saúde de todos os resultados de testes diagnóstico para SARSCoV-2 realizados por laboratórios da rede pública, rede privada, universitários e quaisquer outros, em todo território nacional, deverão ser notificados todos os resultados de testes diagnóstico realizados, sejam positivos, negativos, inconclusivos e correlatos, qualquer que seja a metodologia utilizada.

Para fins de vigilância epidemiológica e direcionamento de estratégias voltadas para atendimento à população é FUNDAMENTAL que os resultados dos exames laboratoriais para detecção de SARS-CoV-2 realizados em laboratórios de saúde suplementar, que não utilizam o Sistema GAL, sejam reportados ao Ministério da Saúde, por meio da Rede Nacional de Dados para Saúde (RNDS). Estes laboratórios deverão solicitar o uso da RNDS por meio do portal de serviços do Ministério da Saúde, disponível no endereço eletrônico: <https://servicos-datasus.saude.gov.br>. Serão disponibilizados aos laboratórios toda a documentação técnica e suporte para eventuais dúvidas no endereço eletrônico: <https://rnds.saude.gov.br>.

Além disso, para garantir o fluxo de informações epidemiológicas produzidas pela rede de laboratórios públicos e privados e agilizar o envio e recebimento das amostras, os Laboratórios de saúde pública e os laboratórios de saúde suplementar do estado, habilitados pelo IEC ou pelo LACEN-PA para realização de análises laboratoriais por biologia molecular pela



metodologia de RT-qPCR deverão inserir os resultados no sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), conforme rotina já estabelecida.

11. CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS EM LABORATÓRIOS HABILITADOS E PARCEIROS

A guarda e conservação das alíquotas das amostras fazem-se necessário para as seguintes situações:

- a. Necessidade de investigação de possíveis reinfecções causadas pelo SARS-CoV-2 conforme preconiza a NOTA TÉCNICA Nº 59/2021-CGPNI/DEIDT/SVS/MS e NOTA TÉCNICA SOBRE POSSÍVEL REINFECÇÃO PELO VÍRUS SARS-COV-2 Nº 001/2020 – DEPI/DVS/LACEN/SESPA- 20/11/2020 que determina que quando houver caso suspeito de reinfecção (dois resultados positivos de RT-PCR em tempo real para o vírus SARS-CoV-2 no intervalo igual ou superior a 90 dias entre os dois episódios de infecção respiratória, independente da condição clínica observada nos dois episódios para um mesmo indivíduo) uma alíquota das duas amostras detectáveis deverá ser encaminhada ao Laboratório de Referência Nacional para realização do sequenciamento genético do SARS-COV-2.
- b. Necessidade de atender demandas judiciais que envolvam diagnósticos de SARS-COV-2 realizados pela instituição que fez a testagem.
- c. Necessidade de confirmação diagnóstica por motivos técnicos.
- d. Para uso nos monitoramentos de circulação de variantes e ações Vigilância Epidemiológica, dentre outros.

Visando a manutenção e estabilidade das amostras tem-se as seguintes considerações:

- ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA PESQUISA DE SARS-Cov-2 por RT-qPCR (Secreção de orofaringe e nasofaringe, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal) a partir de 72 h, deverão ser armazenadas em freezer de Temperatura a - 70º C (Guia de Vigilância Epidemiológica-Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional pela Doença pelo Coronavírus 2019 –COVID-19, 2021).



- TEMPO DE GUARDA: o período de guarda das amostras biológicas com resultado DETECTÁVEL ou NÃO DETECTÁVEL OU INCONCLUSIVO para SARS-CoV-2 por RT-qPCR deverá ser obedecido através de normativas e de iniciativa institucional, devido à ausência de lei ou regulamentação no Brasil que trate especificamente deste tema, e que garanta a **rastreabilidade** da amostra, sugere-se que fiquem acondicionadas por pelo menos 1 ano.

Fica revogada a **NOTA INFORMATIVA Nº 09/2020 – LACEN/DVS/SESPA**.



REFERÊNCIAS

SESPA. **Nota Técnica No 03 DCIH / DVS /SESPA. Dispõe sobre o Manejo de Corps no Contexto do Novo Coronavírus COVID-19.** 2020. Disponível em: <http://www.saude.pa.gov.br/download/nota-tecnica-no-03-dcih-dvs-sespa-manejo-de-corpos-no-contexto-do-novo-coronavirus-covid-19-05-04-2020/>. Acesso em 07/08/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim COE Covid-19, doença pelo coronavírus 2019, Especial Vigilância Epidemiológica Laboratorial, Nº 12. 2020.** Disponível em: <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/April/19/BE12-Boletim-do-COE.pdf>. Acesso em 07/08/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico Especial, Nº 16, COE-Covid-19.** 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/May/21/2020-05-19---BEE16---Boletim-do-COE-13h.pdf>. Acesso em 07/08/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico Especial, Nº 22, COE-Covid-19.** 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/July/15/Boletim-epidemiologico-COVID-22.pdf>. Acesso em 07/08/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 1.792, de 17 de julho de 2020. Altera a Portaria nº 356/GM/MS, de 11 de março de 2020, para dispor sobre a obrigatoriedade de notificação ao Ministério da Saúde de todos os resultados de testes diagnóstico para SARSCoV- 2 realizados por laboratórios da rede pública, rede privada, universitários e quaisquer outros, em todo território nacional.** 2020. Disponível em <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-1.792-de-17-de-julho-de-2020-267730859>. Acesso em 22/07/2020

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico Especial, Nº 25, COE-Covid-19.** 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/12/Boletim-epidemiologico-COVID-25-final--1-.pdf>. Acesso em 07/08/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional pela Doença pelo Coronavírus 2019- Vigilância integrada de Síndromes Respiratórias Agudas-COVID 19.** 2021.



Disponível em [file:///C:/Users/57191272/Downloads/Guia-de-vigila%C8%82ncia-epidemiolo%C8%81gica-da-covid 19 15.03 2021.pdf](file:///C:/Users/57191272/Downloads/Guia-de-vigila%C8%82ncia-epidemiolo%C8%81gica-da-covid%2019%2015.03%202021.pdf). Acesso em 22/03/2021.

PUBLICA, Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde. **Envio aos NIC de amostras positivas e Negativas para SARS-Cov-2.** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <direcao.lacen@lacen.pa.gov.br> em 26 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil. 2016.** Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_laboratorial_influenza_vigilancia_influenza_brasil.pdf. Acesso em 20/10/2020.

ELABORAÇÃO: Laboratório Central do Estado do Pará – LACEN PA

