

NOTA TÉCNICA – NT 01/2016
DVDTV – Lacer/PR

ARBOVÍRUS: DENGUE – CHIKUNGUNYA – ZIKA

Utilização do Teste Rápido Dengue e Pesquisa de Arbovírus por Biologia Molecular (RT-PCR Multiplex)

Epidemiologia

Dengue, Chikungunya e Zika são Arboviroses de importância sócio econômica, que afetam o ser humano e constituem sério problema de saúde pública no mundo. Ocorrem e disseminam-se especialmente nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito transmissor. Apresentam sazonalidade coincidente com o verão e seu controle principal são as medidas de combate ao mosquito transmissor.

Notificação/Investigação

Dengue e Chikungunya deverão ser notificadas e investigadas pelo SINAN *on line* em Ficha de Investigação Dengue e Febre Chikungunya obedecendo aos CID A90 e A92.

Zika deverá ser notificada pelo SINAN NET única e exclusivamente obedecendo ao CID 92.8.

As ações de controle seletivo de vetor estão indicadas na notificação de caso suspeito, não devendo aguardar a confirmação laboratorial.

Atender as orientações contidas no Guia de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, no Manual de Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue e no Manual de Manejo Clínico da Dengue, no que trata do encerramento dos casos por critério laboratorial e clínico epidemiológico.

Definição de caso suspeito:

Dengue: paciente com febre aguda, com duração máxima de 7 dias, **acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas:** cefaleia, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, prostração, exantema, leucopenia, petéquia ou prova do laço positiva. Além desses sintomas, deve ter estado, nos últimos 15 dias, em área onde esteja ocorrendo transmissão de Dengue ou tenha a presença de *Aedes aegypti*

Chikungunya: Paciente com febre de início súbito maior que 38,5°C e intensa poliartalgia, podendo ser acompanhada de cefaleia, exantema, fadiga e dorsalgia com duração média de 7 dias, sendo **residente ou tendo visitado áreas endêmicas ou epidêmicas nos últimos 15 dias, antes do início dos sintomas** ou que tenha vínculo epidemiológico com caso confirmado ou com exame negativo para Dengue que mantenha sintomatologia por mais de 8 dias do início dos sintomas

Zika: paciente que apresente exantema maculopapular pruriginoso ou não, acompanhado de pelo menos **um dos seguintes sinais ou sintomas:** febre OU hiperemia conjuntival sem secreção/prurido OU poliartalgia OU edema periarticular.

TESTE RÁPIDO DENGUE

A Superintendência de Vigilância em Saúde – SVS, disponibiliza, dentro das condições de estoque do insumo, o Teste Rápido de Dengue - TR Dengue, o qual tem como finalidade:

- Acelerar a identificação dos primeiros casos suspeitos, em tempo oportuno, a fim de possibilitar ações de controle;
- Evidenciar a circulação/transmissão do vírus da Dengue em determinada localidade;
- Confirmar precocemente os primeiros casos notificados de Dengue;
- Identificar período pré-epidêmico com o início da ocorrência de transmissão de Dengue, observado pelo aumento de notificações no Sistema Nacional de Notificação – SINAN.

As Regionais de Saúde, em conjunto com o Lacen/PR e Divisão de Doenças Transmitidas por Vetores - DVDTV, deverão indicar um ou mais laboratórios para realizar o TR Dengue para os municípios de sua abrangência.

O TR Dengue poderá ser utilizado em laboratórios de Unidades Sentinelas: Pronto Atendimento, Hospitais Regionais, Hospitais Municipais, Hospitais Universitários, para atenção especial dos casos graves suspeitos de Dengue.

O laboratório que realizar o TR Dengue deverá emitir laudo do teste realizado, no Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL. Para isto, solicitar ao Lacen/PR, permissão para emissão de laudo no GAL.

Ao utilizar o TR Dengue, independentemente da fase da doença, executar o teste nos 3 poços, sendo NS1, IgM e IgG e colocar no GAL os 3 resultados obtidos.

Observar as orientações que acompanham o Kit de TR Dengue e os procedimentos para realização do teste.

As Regionais de Saúde deverão preencher mensalmente na pasta y da DVDTV o relatório, de recebimento, utilização e resultados dos TR Dengue.

As Regionais de Saúde deverão solicitar o TR Dengue junto à DVDTV, através do e-mail: silmara.carvalho@sesa.pr.gov.br

O Lacen/PR fará o envio dos TR Dengue de acordo com a aprovação da DVDTV, conforme situação epidemiológica de casos de Dengue nos municípios que compõem as Regionais de Saúde e o quantitativo de kits disponíveis.

ENVIO DE AMOSTRAS DE SORO AO LACEN/PR

O laboratório de saúde pública tem como função básica realizar exames para as vigilâncias epidemiológica, sanitária e ambiental, com foco na saúde pública coletiva. Não executa exames para diagnóstico clínico do paciente, individualmente.

Enviar amostras de soro conforme orientações do Manual de Coleta e Envio de Amostras Biológicas ao Lacen/PR (<http://www.lacen.saude.pr.gov.br/>).

1. MUNICÍPIOS NÃO EPIDÊMICOS OU PRÉ-EPIDÊMICOS

1.1. Em Uso do Teste Rápido de Dengue

- Até o 5º dia do início dos sintomas:

a) NS1 positivo – encaminhar todos os soros ao Lacen/PR para Pesquisa de Arbovírus, até a identificação do sorotipo circulante definida pela Coordenação Estadual da Dengue - SESA/PR. A partir da identificação do sorotipo circulante, a estratégia de envio de amostras será estabelecida pelas vigilâncias municipal/estadual e Lacen/PR (Guia de Vigilância Epidemiológica/MS);

b) NS1 negativo – aguardar preferencialmente até o 10º dia para coletar 2ª amostra de soro e encaminhar para Lacen/PR ou para o Laboratório de Referência de sua região para a pesquisa de Dengue IgM;

GESTANTES – encaminhar soro de toda gestante suspeita com qualquer resultado de NS1, ao Lacen/PR para Pesquisa de Arbovírus, com enfoque na pesquisa de Zika Vírus.

- A partir do 6º dia do início dos sintomas, preferencialmente após o 10º dia:

a) IgM positivo – caso confirmado. Não há necessidade de encaminhar soro ao Lacen/PR ou para o Laboratório de Referência de sua região;

b) IgM negativo – Investigar, quando necessário, Chikungunya ou outras patologias compatíveis com o quadro clínico e história epidemiológica apresentados. Encaminhar soro ao Lacen/PR.

1.2. Sem Uso do Teste Rápido de Dengue

- Até o 5º dia do início dos sintomas:

Encaminhar todos os soros ao Lacen/PR para Pesquisa de Arbovírus, até a identificação do sorotipo circulante, definida pela Coordenação Estadual da Dengue - SESA/PR.

A partir da identificação do sorotipo circulante, a estratégia de envio de amostras será estabelecida pelas vigilâncias municipal/estadual e Lacen/PR (Guia de Vigilância Epidemiológica/MS).

Observação: amostras coletadas poderão ser canceladas se a estratégia estabelecida pelas vigilâncias municipal/estadual e Lacen/PR considerar que já houve resposta epidemiológica suficiente para as ações.

A sorotipagem para Dengue, pelo método de biologia molecular, será realizada conforme a capacidade operacional e direcionamento do Lacen/PR, sendo que o objetivo é a identificação do sorotipo circulante e vigilância da introdução de novo sorotipo de Dengue.

- A partir do 6º dia do início dos sintomas, preferencialmente após o 10º dia:

Encaminhar soro para Dengue IgM, ao Lacen/PR ou para o Laboratório de Referência de sua região;

Se houver suspeita de Chikungunya incluir mais 01 tubo de soro para esta pesquisa e encaminhar ao Lacen/PR.

2. MUNICÍPIOS EPIDÊMICOS

Não há necessidade de uso do Teste Rápido de Dengue.
Poderá ser utilizado em casos graves e óbitos, se disponível.

- Até o 5º dia do início dos sintomas:

Pesquisa de Arbovírus - Coletar soro de 10% dos casos suspeitos, ou seja, coletar de 01 a cada 10 pacientes atendidos e encaminhar ao Lacen/PR;

GESTANTES – encaminhar soro de toda gestante suspeita ao Lacen/PR para Pesquisa de Arbovírus, com enfoque na pesquisa de Zika vírus.

A coleta é obrigatória para 100% dos casos graves.

- A partir do 6º dia do início dos sintomas, preferencialmente após o 10º dia:

Pesquisa de Dengue IgM - Coletar soro de 10% dos casos suspeitos, ou seja, coletar de 01 a cada 10 pacientes atendidos e encaminhar ao Lacen/PR;

A coleta é obrigatória para 100% dos casos graves.

Observação: Para municípios ou localidades em situação epidêmica o diagnóstico dos casos deverá ser feito por critério clínico-epidemiológico ou através de pesquisa laboratorial em laboratórios municipais ou locais, a critério médico.

O Lacen/PR não realiza contra prova/confirmação de exames realizados por outros laboratórios. Porém, poderá realizar exame laboratorial para confirmação/descarte de casos de interesse epidemiológico, a critério da Coordenação Estadual da Dengue - SESA/PR.

PESQUISA DE ZIKA VÍRUS POR BIOLOGIA MOLECULAR (RT-PCR – MULTIPLEX)

Enviar amostras de soro ao Lacen/PR, coletadas até o 5º dia da data de início dos sintomas, que atenda descrição de caso suspeito de infecção pelo Zika Vírus.

Após a confirmação de circulação autóctone, os demais casos agudos de Zika devem ser confirmados por critério clínico-epidemiológico

(<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/07/Nota-Informativa-zika.pdf>), exceto para os seguintes grupos:

- **Gestantes** – independente da data de início de sintomas - seguir “Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia Relacionada à Infecção pelo Vírus Zika” (Protocolo Complementar ao do Ministério da Saúde) – Versão 1.4 – Paraná;

- **Síndromes Neurológicas** – independente da data de início de sintomas - seguir “Protocolo de Vigilância da Síndrome de Guillain-Barré e outras Doenças Neurológicas Agudas Graves Pós-Infeciosas” (Protocolo Complementar ao do Ministério da Saúde) – Versão 3.0 – Paraná;

- **Óbitos;**

- **Recém-natos** – de gestantes com exantema agudo ou referido;

- **Casos graves e casos atípicos.**

Importante:

- As amostras para pesquisa por Biologia Molecular (RT-PCR – MULTIPLEX) deverão ser sempre congeladas, devido às exigências do método e do RNA viral o qual mantém melhor estabilidade sob congelamento. Evitar ciclos de congelamento e descongelamento destas amostras.

- Não há disponível, ainda, Pesquisa para Zika IgM, autorizado pelo Ministério da Saúde, para uso no Lacen.
- Informar no GAL: a data de início dos sintomas (campo obrigatório), no campo “Agravado” marcar se é Dengue, Chikungunya ou Zika, conforme a notificação no SINAN. Também, informar se é gestante e qual período gestacional, dados clínicos, se tomou vacina contra Dengue, a data da vacinação e qual a dose (1ª, 2ª ou 3ª). Sempre informar, no campo “Caso” se é caso de óbito, surto, suspeito, entre outros.
- Identificar os materiais com a etiqueta do GAL (código de barras).

O Lacen/PR fornece os seguintes materiais para o envio das amostras:

- Tubo de poliestireno com tampa de cor amarela para separação de soro;
- Microtubo com tampa de rosca, livre de DNase e RNase, específico para pesquisas por Biologia Molecular, para envio de soro ou líquido;
- Pipeta descartável tipo “Pasteur” para separação do soro;
- Tubo estéril de 15 mL, tubo tipo “Falcon” para envio de urina, fragmentos de placenta e fragmentos de peças anatômicas de natimorto e aborto;
- Formalina Tamponada a 10% para a coleta de placenta e peças anatômicas para exame Histopatológico e Imunohistoquímico.

Crítérios de Rejeição de Amostras:

- Frasco incompatível para a pesquisa por Biologia Molecular. Serão aceitos somente os microtubos fornecidos pelo Lacen/PR;
- Volume insuficiente de amostra. Deverão ser enviados 2 microtubos com, no mínimo, 1 mL de soro em cada;
- Soro hemolisado;
- Solicitação de exame incompatível com a data do início dos sintomas. Até o 5º dia da data de início de sintomas, solicitar Pesquisa de Arbovírus – Biologia Molecular e após o 6º dia da data de início de sintomas, solicitar Pesquisa de Dengue IgM ou Chikungunya IgM ou outras diferenciais;
- Falta de cadastro no GAL;
- Falta de dados completos do paciente no GAL;
- Falta da etiqueta do GAL com a identificação do paciente, no recipiente que contém a amostra;
- Etiqueta afixada ao tubo de maneira incorreta. Ver orientação de identificação do microtubo para biologia molecular abaixo.
- Amostras de soro para sorotipagem da Dengue coletadas com mais de cinco dias a partir do início dos sintomas, mesmo com resultado de NS1 positivo;
- Envio de amostras sem estar aliquotadas para cada exame solicitado na guia médica e cadastrado no GAL. O Lacen/PR não fará aliquotagem de amostras.

Observação: Cada exame cadastrado deverá ser encaminhado ao Lacen/PR acompanhado da ficha de cadastro do GAL, com todos os campos preenchidos, sendo um único cadastro no GAL, por paciente, por dia.

As amostras que chegarem ao Lacen/PR, sem atender às definições de casos suspeitos e/ou aos critérios de qualidade de amostra, serão descartadas no GAL.

Ressalta-se que a confiabilidade dos resultados dos testes laboratoriais depende do período e dos cuidados durante a coleta, manuseio, acondicionamento e transporte dos espécimes biológicos, destacando-se a baixa viabilidade do vírus Zika frente ao manuseio (ex: congelamento e descongelamento).

IDENTIFICAÇÃO DO MICROTUBO PARA BIOLOGIA MOLECULAR

Para a identificação dos microtubos para Biologia Molecular, conforme a Figura 1, seguir os seguintes procedimentos:

- 1) Gerar etiqueta do GAL com a identificação do paciente, com opção “por requisição”;
- 2) Cortar, com tesoura, a etiqueta, preservando o código de barras;

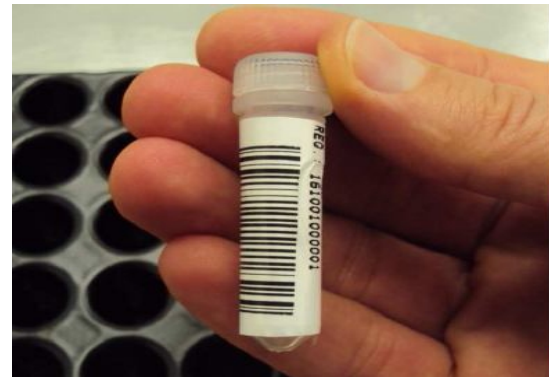
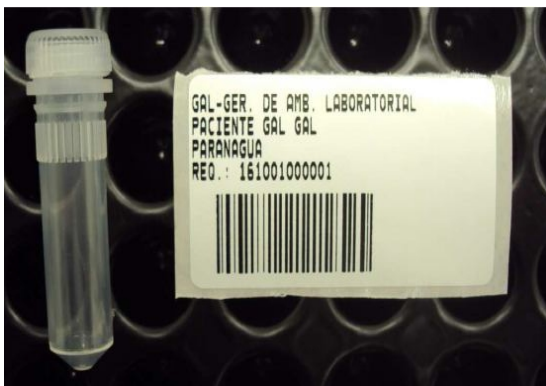
NÃO DANIFICAR O CÓDIGO DE BARRAS EM HIPÓTESE NENHUMA;

- 3) Colar a etiqueta, no microtubo para Biologia Molecular, na posição vertical com o início da etiqueta na parte superior;

IMPORTANTE: RESPEITAR O SENTIDO MOSTRADO NA FIGURA 1.

- 4) O microtubo para Biologia Molecular está pronto para acondicionar a amostra de soro.

Figura 1 - Procedimento para Identificação do Microtubo para Biologia Molecular



ENVIO DE AMOSTRAS DE SORO AO LACEN/PR APÓS VACINA CONTRA DENGUE

Todo indivíduo que recebeu a vacina contra Dengue e apresentar sintomatologia suspeita de Dengue ou reação adversa, será considerado caso suspeito e deverá obrigatoriamente coletar amostra para a Pesquisa de Arbovírus e encaminhar ao Lacen/PR.

As amostras deverão ser coletadas o mais breve possível, dentro dos primeiros cinco dias após o início dos sintomas. O primeiro dia dos sintomas é a data ideal para a coleta de amostra de soro, neste caso.

A coleta e envio de amostras deverá atender aos mesmos cuidados e critérios para a Pesquisa de Arbovírus.

COMO INTERPRETAR RESULTADOS EM PACIENTES VACINADOS?

Teste Rápido Dengue:

- **NS1:** Vacina não gera resultados reagentes para NS1. Se reagente, sugestivo de infecção aguda por vírus dengue.
- **IgM e IgG:** Vacina promove a soroconversão com produção de IgM e IgG. Não é possível diferenciar cicatriz vacinal e reação imune à infecção natural por vírus da Dengue. Pode haver reações cruzadas com outros Flavivirus (Febre amarela e Zika).

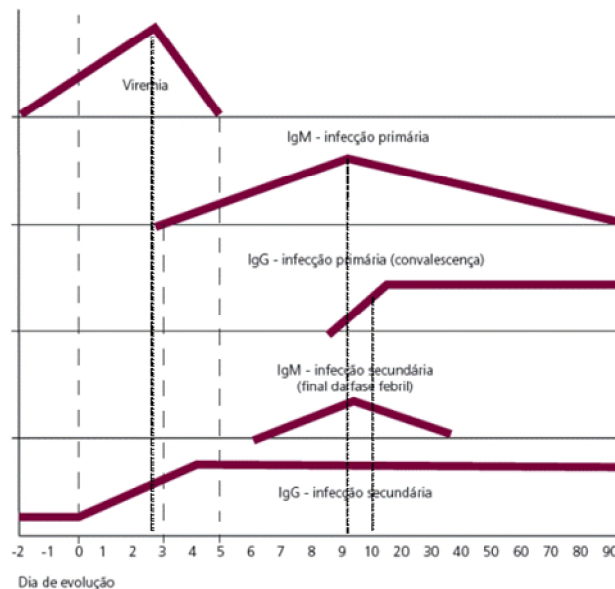
Biologia Molecular (RT-PCR – Multiplex) para DenV, ChikV e ZikV: Vírus vacinal contém seqüências genômicas de DenV2, DenV3 e DenV4 usadas como alvo para detecção molecular. Pode levar a resultados detectáveis. São necessários estudos para avaliar o desempenho do sistema diagnóstico na população vacinada. A seqüência genômica do DenV1 da vacina não é detectável pelo teste Multiplex usado no Lacen/PR.

Enzimaimunoensaio (ELISA) para Dengue IgM e IgG: Vacina promove a soroconversão com produção de IgM e IgG. Não é possível diferenciar cicatriz vacinal de reação imune à infecção natural por vírus da Dengue. Pode haver reações cruzadas com outros Flavivirus (Febre amarela e Zika).

Possibilidades para Interpretação de Resultados com Utilização do TR Dengue conforme Figura 2			
TR Dengue			
NS1	IgM	IgG	Interpretação
Neg	Neg	Neg	Amostra negativa - quantidade de antígenos ou de imunoglobulinas insuficientes para detecção da presença de Flavivírus.
Pos	Neg	Neg	Amostra positiva para detecção da presença de Flavivírus em fase de viremia. Primeira infecção devido a IgG não reagente indicando que não houve infecção anterior de Dengue.
Pos	Pos	Neg	Amostra positiva para detecção da presença de Flavivírus em fase de viremia, entre o 3º e 5º dia de evolução, com início de resposta imunológica por IgM. Primeira infecção devido a IgG não reagente indicando que não houve infecção anterior de Dengue.
Pos	Pos	Pos	Amostra positiva para detecção da presença de Flavivírus em fase de viremia, entre o 3º e 5º dia de evolução, com início de resposta imunológica por IgM. IgG reagente indicando que houve infecção anterior de Dengue.
Pos	Neg	Pos	Amostra positiva para detecção da presença de Flavivírus em fase de viremia, nos primeiros dias após infecção. IgG reagente indicando que houve infecção anterior de Dengue.
Neg	Pos	Neg	Amostra positiva para detecção de IgM para Flavivírus, com início de resposta imunológica para primeira infecção. IgG não reagente indicando que não houve infecção anterior de Dengue.
Neg	Pos	Pos	Amostra positiva para detecção de imunoglobulinas para Flavivírus. Primeira infecção entre o 5º e 10º dia de evolução. IgG reagente indicando que houve infecção anterior de Dengue.
Neg	Neg	Pos	Amostra negativa para infecção recente ou quantidade de antígenos insuficientes para detecção da presença de Flavivírus ou resposta imunológica por IgM. IgG reagente indicando que houve infecção anterior de Dengue.

Obs: A não coloração da banda controle invalida o resultado do teste.
Pos = Positivo; Neg = Negativo

Figura 2. Resposta antígeno-anticorpo na infecção por dengue



Fonte: Opas. Adaptado da publicação: Dengue – Guías de Atención para Enfermos em la Región de las Américas. La Paz, Bolivia, 2010.

Possibilidades para Interpretação de Resultados com Utilização do TR Dengue e Pesquisa de Arbovírus		
NS1 do TR Dengue	Pesquisa Arbovírus por Biologia Molecular	Interpretação
Positivo	Não Detectável para Dengue	Amostra positiva para detecção da presença de Flavivírus (Fase de viremia) pelo TR Dengue. Amostra não viável para pesquisa de Arbovírus (possibilidade de falha na fase pré-analítica)
Positivo	Detectável para Dengue	Amostra positiva para detecção da presença de Flavivírus (Fase de viremia) pelo TR Dengue. O resultado da Pesquisa de Arbovírus identifica o agente etiológico.
Negativo	Não Detectável para Dengue	Ausência de infecção pelo vírus da Dengue
Negativo	Detectável para Dengue	Possível falha na execução do TR Dengue. O resultado da Pesquisa de Arbovírus identifica o agente etiológico.

Poderá ocorrer reatividade cruzada entre os anticorpos produzidos para combater infecções por Flavivírus, levando a reações falso-positivas e dificultando a interpretação dos testes sorológicos.

Esta Nota Técnica revoga todas as anteriores no que trata dos mesmos assuntos quanto à utilização do TR Dengue e Arbovírus.