

Diretrizes Laboratoriais para o Diagnóstico e Detecção de Infecção pelo Novo Coronavírus (2019-nCoV)

OPAS/BRA/nCov/20.009

01 de fevereiro de 2020

Os coronavírus são um grupo de vírus de RNA altamente diverso da família Coronaviridae, dividido em 4 gêneros: alfa, beta, gama e delta, causadores de doenças que variam de leve a grave em humanos e animais (1) (2) (3). Existem coronavírus humanos endêmicos como o alfa-coronavírus 229E e NL63 e os betacoronavírus OC43 e HKU1 que podem causar doenças semelhantes à *influenza* ou pneumonia em humanos (1) (3). No entanto, dois coronavírus zoonóticos surgiram causando doença grave em humanos: coronavírus com síndrome respiratória aguda grave (SARS – CoV) em 2002-2003 e coronavírus com síndrome respiratória no Oriente Médio (MERS-CoV) (4) (5).

Em janeiro de 2020, o agente etiológico responsável por um aglomerado de casos graves de pneumonia em Wuhan, na China, foi identificado como um novo Betacoronavírus, mas é distinto do SARS-CoV e MERS-CoV (6) (7). A sequência completa do genoma desse novo agente foi liberada e diferentes protocolos de detecção foram desenvolvidos, mas ainda não foram totalmente validados. Entretanto, à luz da possível introdução de um caso suspeito de 2019-nCoV na região das Américas, a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) recomenda aos Estados Membros que garantam sua identificação oportuna, o transporte de amostras para laboratórios nacionais e de referência e a implementação do protocolo de detecção molecular para o 2019-nCoV, de acordo com a capacidade do laboratório.

A OMS publicou em 17 de janeiro de 2020 uma atualização das orientações provisórias para testes laboratoriais para o novo coronavírus de 2019 (2019-nCoV) em casos humanos suspeitos disponíveis em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus/laboratory-diagnostics-for-novel-coronavirus>.

Informações sobre definição de caso suspeito; coleta e transporte de amostras; uso efetivo da rede global de laboratórios; testes de 2019-nCoV em laboratórios de referência; e relato de casos e resultados de testes podem ser encontrados nesta orientação provisória.

Coleta de amostras e transporte apropriado

As amostras devem ser coletadas por pessoal treinado e considerando todas as instruções de biossegurança, incluindo o uso de equipamento de proteção individual apropriado para vírus respiratórios.

As amostras recomendadas são as do trato respiratório inferior, incluindo escarro, lavagem broncoalveolar e aspirado traqueal (quando possível, de acordo com critérios médicos). No entanto, quando a coleta de uma amostra do trato respiratório inferior não for possível, as amostras do trato respiratório superior também são úteis. Em geral, é recomendada a coleta de um esfregaço nasofaríngeo e de um orofaríngeo (os esfregaços devem ser colocados e transportados no mesmo tubo com o meio de transporte viral). Embora a amostragem de contatos assintomáticos não seja recomendada rotineiramente, se for considerada necessária, e de acordo com as diretrizes nacionais, as amostras das vias aéreas superiores devem ser consideradas.

As amostras devem ser mantidas refrigeradas (4 a 8 °C) e enviadas ao laboratório (central, nacional ou de referência), onde serão processadas dentro de 24 a 72 horas após a coleta. Se as amostras não puderem ser enviadas dentro desse período, recomenda-se o congelamento a -70 °C (ou menos) até que as amostras sejam enviadas (garantindo que a cadeia de frio seja mantida).

O envio de amostras suspeitas para laboratórios de referência ou centros colaboradores fora do país e por via aérea deve garantir a conformidade com todas as normas internacionais (IATA) para a Categoria de Substâncias Biológicas B.

Testes Laboratoriais

A OMS disponibilizou alguns protocolos para o diagnóstico molecular *do novo coronavírus 2019 (2019-nCoV) para os casos humanos suspeitos*, na página da web. Os nomes de fornecedores ou fabricantes incluídos nos protocolos não são endossados pela OMS. Além disso, esses protocolos ainda não foram validados pelo processo da OMS.

O Centro para Controle de Doenças (CDC) dos EUA desenvolveu um protocolo para a detecção de 2019-nCoV. Este protocolo pode ser acessado no seguinte link: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf>

Atualmente, a OPAS está trabalhando para implementar o primeiro protocolo disponibilizado pela OMS, desenvolvido pelo Hospital Charité, Berlim, Alemanha. Esse protocolo foi publicado e pode ser acessado no seguinte link: <https://www.eurosurveillance.org/docserver/fulltext/eurosurveillance/25/3/eurosurv-25-3-5.pdf?expires=1580420806&id=id&accname=guest&checksum=D2E250BE3914A24D9381FC9538EFF11D>

Esse protocolo é baseado na detecção de três marcadores diferentes: genes N, E e RdRp. Os ensaios para os genes E e N destinam-se a protocolos de triagem para detectar qualquer beta-coronavírus associado ao morcego (não detectar coronavírus humano comum); o RdRp é específico para o coronavírus SARS e parecido ao SARS (incluindo o 2019 – nCoV).

Portanto, para um fluxo de trabalho de rotina, é sugerido executar primeiro o ensaio do gene N ou E (não é necessário executar os dois) como ferramenta de triagem, seguido de testes confirmatórios com o ensaio do gene RdRp (8).

Algoritmo de teste

Os laboratórios devem continuar a usar o algoritmo de teste de *influenza* recomendado pela OPAS para vigilância de rotina de *influenza* e casos incomuns de SRAG.

Os testes para o nCoV devem ser considerados **apenas para pacientes que se enquadram na definição de caso, uma vez descartada a *influenza* e outros vírus respiratórios, exceto o 2019-nCoV**. Se houver suspeita de *Influenza* aviária, o diagnóstico deve ser realizado pelos NIC. As definições provisórias de casos para vigilância epidemiológica e suas atualizações estão disponíveis em [https://www.who.int/internal-publications-detail/surveillance-case-definitions-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(ncov\)](https://www.who.int/internal-publications-detail/surveillance-case-definitions-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(ncov))

Fortalecimento da capacidade laboratorial e do fluxo de amostras

Para fortalecer a capacidade de resposta do laboratório para o nCoV nas Américas e considerando a heterogeneidade dos Centros Nacionais de *Influenza* e Laboratórios Nacionais de *Influenza* em toda a Região, a OPAS propôs três possíveis cenários de resposta:

1. Laboratórios sem capacidade de diagnóstico molecular

Os laboratórios sem capacidade de diagnóstico molecular para implementar o protocolo molecular de 2019-nCoV devem enviar amostras clínicas suspeitas (ajustando estritamente a definição de caso) a um laboratório de referência.

O escritório regional da OPAS deve ser consultado antes de encaminhar as amostras clínicas suspeitas do nCoV para o laboratório de referência.

2. Laboratórios com capacidade de diagnóstico molecular

2a. Laboratórios com capacidade de diagnóstico molecular para implementar a detecção molecular de 2019-nCoV

Laboratórios com capacidade de diagnóstico molecular podem considerar a implementação de um dos dois protocolos de detecção molecular de 2019-nCoV disponibilizados pela OMS, conforme citado acima.

As sequências de primers e sondas para síntese de oligonucleotídeos e protocolos de bancada estão disponíveis em cada protocolo citado*.

As amostras positivas por detecção molecular devem ser imediatamente notificadas por meio dos canais oficiais de RSI.

A OPAS deve ser consultada previamente para encaminhar amostras positivas de 2019-nCoV a um laboratório de referência.

2b. Laboratórios com capacidade de diagnóstico molecular e sequenciamento

Laboratórios com capacidade de diagnóstico molecular podem considerar a implementação de um dos dois protocolos de detecção molecular de nCoV disponibilizados pela OMS, conforme citado acima.

As sequências de primers e sondas para síntese de oligonucleotídeos e protocolos de bancada estão disponíveis em cada protocolo citado*.

Adicionalmente ao diagnóstico molecular por RT-PCR em tempo real, os laboratórios com capacidade podem realizar os protocolos de sequenciamento para identificação específica de 2019-nCoV, por meio do sequenciamento Sanger ou sequenciamento de nova geração, apenas em amostras positivas no RT-PCR em tempo real.

* Para apoiar os laboratórios da Região das Américas, a OPAS forneceu controles positivos apenas para o protocolo de detecção diagnóstica de coronavírus Wuhan 2019 por RT-PCR em tempo real – Charité, Berlim Alemanha.

É importante ressaltar que amostras positivas por detecção molecular devem ser imediatamente notificadas por meio dos canais oficiais do RSI.

Laboratórios com capacidade de sequenciamento são incentivados a sequenciar oportunamente amostras positivas e compartilhar informações genéticas por meio da Iniciativa Global sobre Compartilhamento de toda a plataforma de dados de *Influenza* (GISAID) e GenBank.

A OPAS deve ser previamente consultada para encaminhar amostras positivas para 2019-nCoV a um laboratório de referência.

2c. Laboratórios com diagnóstico molecular para não implementar a detecção molecular de nCoV

Os laboratórios com capacidade de diagnóstico molecular, mas sem capacidade de sintetizar os oligonucleotídeos necessários ou implementar o diagnóstico molecular para o nCoV, devem seguir as orientações para laboratórios sem capacidade de diagnóstico molecular (item 1).

Envio de amostras para o laboratório de referência no CDC

É importante ter em mente que o Laboratório de referência para o diagnóstico de 2019-nCoV nos Estados Unidos da América é Laboratório de Diagnóstico de Vírus Respiratórios no US – CDC.

As amostras rotineiras de diagnóstico de *Influenza* na região da América devem ser encaminhadas para o Centro de Colaboradores da *Influenza* da OMS, que é o CDC.

Para obter informações logísticas e de remessa de amostras suspeitas de nCoV para o CDC, a OPAS deve ser contatada.

Os resultados obtidos no Centro Nacional de *Influenza* ou no Laboratório Nacional de Saúde Pública devem ser informados imediatamente, de acordo com os canais estabelecidos, para garantir as ações necessárias. Como referência, os laboratórios têm a opção de enviar as primeiras amostras negativas (até 5 amostras) e as primeiras amostras positivas (até 10 amostras) ao laboratório do CDC.

Referências

1. **Hui, DSC and Zumla, A.** Severe Acute Respiratory Syndrome – Historical, Epidemiologic; and Clinical Features. [book auth.] HW Boucher, A Zumla and DSC Hui. *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases – Clinics Review Articles*. Philadelphia : Elsevier, 2019, pp. 869-889.
2. **Drosten, C,** et al. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med*. 2003, Vol. 9, pp. 325-7.
3. **EI, Azhar,** et al. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). [book auth.] Boucher HW, Zumla A and DSC Hui. *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases – Clinics Review Articles*. Philadelphia : Elsevier, 2019, pp. 891-905.
4. **de Wit, E,** et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2016, Vol. 14, pp. 523-524.
5. **R, Hilgenfeld and M, Peiris.** From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res*. 2013, Vol. 100, pp. 286-95.
6. **Organization, World Health.** Laboratory testing of human suspected cases of novel coronavirus (nCoV) infection – Interim guidance. *WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.1*. [Online] January 17, 2020. <https://www.who.int/health-topics/coronavirus/laboratory-diagnostics-for-novel-coronavirus>.
7. **GISAID.** Newly discovered betacoronavirus, Wuhan 2019-2020. *GISAID EpiFlu – Global Initiative on Sharing All Influenza Data*. [Online] January 2020. <https://platform.gisaid.org/epi3/frontend#414223>.
8. **Corman, VM,** et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020, Vol. 25, p. 2000045.