

Testes de diagnóstico para SARS-CoV-2

Guia provisória

11 setembro 2020



Introdução

Este documento fornece orientações provisórias para laboratórios e outras partes interessadas envolvidas no diagnóstico da síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2). As principais considerações para a coleta de amostras, teste de amplificação de ácido nucleico (NAAT), antígeno (Ag), detecção de anticorpos (Ab) e garantia de qualidade são abordados WHElab@who.int.

Alterações da versão anterior

O título desta guia provisória mudou de “Testes de laboratório para COVID-19 em casos humanos suspeitos” para “Testes de diagnóstico para SARS-CoV-2”. Informações adicionais relevantes e um algoritmo de diagnóstico clínico foram adicionados ao documento. Além disso, a guia foi atualizada com novas descobertas da literatura e melhores práticas

Documentos relevantes da OMS

A OMS desenvolveu guias provisórias e resumos técnicos para auxiliar os decisores políticos e os laboratórios nos testes para SARS-CoV-2. Esses documentos cobrem a [estratégia de teste laboratorial](#) [1], [ferramenta de avaliação laboratorial](#) [2], [biossegurança laboratorial](#) [3], [orientações sobre o uso de testes de imunodiagnóstico no atendimento primário](#) [4], [detecção de antígeno no diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 usando imunoenaios rápidos](#) [5], orientações para [investigações de clusters](#) [6], [vigilância em saúde pública](#) [7] e [considerações operacionais para vigilância usando GISRS](#) [8]. Além disso, os [protocolos de investigação de primeiros casos](#) [9] podem ser usados pelos países para implementar estudos epidemiológicos e melhorar a compreensão dos padrões de transmissão, gravidade e prevalência da doença, características clínicas e fatores de risco para infecção por SARS-CoV-2.

Antecedentes em SARS-CoV-2

A OMS foi notificada pela primeira vez sobre um cluster de pneumonia de etiologia desconhecida em Wuhan, República Popular da China, em 31 de dezembro de 2019. O vírus foi inicialmente denominado novo coronavírus 2019 (2019-nCoV).

Posteriormente, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) denominou o vírus SARS-CoV-2 [10]. COVID-19 é o nome da doença causada pelo SARS-CoV-2.

O SARS-CoV-2 é classificado no gênero *Betacoronavirus* (subgênero *Sarbecovirus*) da família *Coronaviridae* [11]. É um vírus de ácido ribonucleico (RNA) fita simples, sentido positivo, com um genoma de 30 kb [10]. O vírus tem um mecanismo de revisão de RNA que mantém a taxa de mutação relativamente baixa. O genoma codifica proteínas não estruturais (algumas essenciais na formação do complexo replicase transcriptase), quatro proteínas estruturais (espícula (S), envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N)) e potenciais proteínas acessórias [12-14]. O vírus se liga a um receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) para a entrada na célula [15-17].

O SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus identificado que infecta humanos (HCoV). Quatro desses vírus, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 e HCoV-OC43, são endêmicos, sazonais e tendem a causar doença respiratória leve. Outros dois vírus são zoonóticos e mais virulentos, o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave do tipo 1 (SARS-CoV-1). O SARS-CoV-2 é geneticamente mais semelhante ao SARS-CoV-1, e ambos os vírus pertencem ao subgênero *Sarbecovirus* dentro do gênero *Betacoronavirus* [11]. No entanto, não se tem conhecimento de circulação do SARS-CoV-1 atualmente na população humana.

A apresentação clínica da infecção por SARS-CoV-2 pode variar de infecção assintomática a doença grave [18-27]. As taxas de mortalidade variam por país [28]. O diagnóstico laboratorial precoce de uma infecção por SARS-CoV-2 pode auxiliar no manejo clínico e no controle do surto. O teste de diagnóstico pode envolver a detecção do próprio vírus (RNA viral ou antígeno) ou a detecção da resposta imune humana à infecção (anticorpos ou outros biomarcadores).

Embora nossa compreensão do SARS-CoV-2 tenha se expandido rapidamente, ainda existem muitas questões pendentes que precisam ser abordadas. A OMS estimula pesquisa e compartilhamento de resultados que possam contribuir para uma melhor caracterização do SARS-CoV-2 [29, 30].

Informações básicas sobre detecção de RNA de SARS-CoV-2

A confirmação padrão de infecções agudas por SARS-CoV-2 é baseada na detecção de sequências virais únicas por testes de amplificação de ácido nucleico (NAATs), como a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (rRT-PCR). Os alvos dos ensaios incluem regiões nos genes E, RdRP, N e S

Uma vez que um indivíduo tenha sido infectado pelo vírus, o tempo médio para aparecimento dos sintomas (período de incubação) é de 5 a 6 dias, com um intervalo de 1 a 14 dias após a exposição [31-35]. O vírus pode ser detectado no trato respiratório superior 1-3 dias antes do início dos sintomas. A concentração de SARS-CoV-2 no trato respiratório superior é mais alta em torno do momento do início dos sintomas, após o qual diminui gradualmente [36-42]. Alguns estudos relatam cargas virais mais altas em pacientes com quadro grave em comparação com pacientes com quadro leve, enquanto outros estudos não relatam tais diferenças [36, 43-49]. A presença de RNA viral no trato respiratório inferior, e para um subconjunto de indivíduos nas fezes, aumenta durante a segunda semana da doença [38]. Em alguns pacientes, o RNA viral só pode ser detectado por vários dias, enquanto em outros pacientes pode ser detectado por várias semanas, possivelmente meses [44, 50-60]. A presença prolongada de RNA viral não significa necessariamente infecção prolongada. Vários estudos descrevem a correlação entre infeciosidade reduzida e i) aumento do número de dias decorridos desde o início e resolução dos sintomas, ii) diminuição da carga viral nas secreções respiratórias [37, 61-64] e iii) um aumento nos anticorpos neutralizantes [37, 61]. Mais informações podem ser encontradas em [Critérios para liberar pacientes com COVID-19 do isolamento](#) [65].

As secreções respiratórias podem ter uma composição bastante variável, e a adequação dos esforços de amostragem também pode variar, o que pode ocasionalmente resultar em resultados falso-negativos de PCR [40, 42, 58, 66-74]. Em pacientes nos quais há forte suspeita de infecção por SARS-CoV-2 e swabs do trato respiratório superior são negativos, o RNA viral pode ser detectado em secreções do trato respiratório inferior, como escarro ou lavagem broncoalveolar [70, 71, 75, 76]. As fezes ou swabs retais em um subconjunto de pacientes mostraram ser positivos para RNA de SARS-CoV-2, com alguns estudos sugerindo que essa positividade é prolongada em comparação com amostras do trato respiratório [46, 56, 59, 75, 77]. Em alguns pacientes, foi relatada a detecção de RNA de SARS-CoV-2 em amostras de sangue e alguns estudos sugerem que a detecção no sangue está associada à gravidade da doença; no entanto, são necessários mais estudos sobre essa associação potencial [75, 78-81]. Em amostras de fluido oral (por exemplo, saliva) [28, 49, 82-88], as taxas de detecção relatadas em comparação com amostras de trato respiratório superior do mesmo paciente variam amplamente, e dados limitados estão disponíveis sobre a adequação da detecção de SARS-CoV-2 em amostras de gargarejo/bochechos [85]. As diferenças marcantes na sensibilidade das avaliações de fluidos orais são potencialmente devidas a grandes diferenças das técnicas de coleta, transporte e armazenamento, assim como na avaliação de diferentes populações de teste. Ocasionalmente, o SARS-CoV-2 pode ser detectado em fluidos oculares em pacientes com e sem sinais de conjuntivite [89-93]. Alguns estudos não detectaram SARS-CoV-2 na urina [58, 75, 94], enquanto outros foram capazes de detectar RNA viral na urina de um número limitado de pacientes [57, 95]. Um estudo relatou vários pacientes com amostras de sêmen positivas [96]. Além disso, a detecção de RNA positivo para tecido cerebral [97] e líquido cefalorraquidiano [98] foi descrita em relatos de casos. Assim, o SARS-CoV-2 pode ser detectado em uma ampla gama de outros fluidos corporais e compartimentos, mas é mais frequentemente detectado em material respiratório e, portanto, as amostras respiratórias continuam sendo o tipo de amostra preferida para o diagnóstico.

Princípios orientadores para testes laboratoriais

A decisão de testar deve ser baseada em ambos fatores, clínicos e epidemiológicos. Ver as guias provisórias [manejo clínico de COVID-19](#) [99], [investigação de clusters](#) [6] e [vigilância em saúde pública](#) [7].

Uma coleta rápida de amostras apropriadas e o diagnóstico laboratorial preciso de pacientes nos quais há forte suspeita de infecção por SARS-CoV-2 são as duas prioridades para apoiar o manejo clínico de pacientes e as medidas de controle de infecção. Dada a complexidade da amostragem adequada, análise laboratorial e interpretação dos resultados, a coleta e o diagnóstico laboratorial devem ser realizados por profissionais treinados e competentes.

Indivíduos infectados com SARS-CoV-2 podem nunca desenvolver sintomas (casos assintomáticos), podem ter doença muito leve (pauci-sintomática) ou podem desenvolver COVID-19 moderada a grave [18-26]. A evidência mais robusta de infecção viral vem da detecção de fragmentos do vírus, como proteínas ou ácidos nucleicos, por meio de testes virológicos. Os indivíduos infectados podem ter teste positivo para ácidos nucleicos virais ou proteínas virais sem sintomas (assintomáticos), ou antes do início dos sintomas (pré-sintomáticos) e durante um episódio da doença (sintomáticos). Para aqueles que desenvolvem a COVID-19, os sintomas podem ser amplos na apresentação inicial da doença. Os indivíduos podem apresentar sintomas muito leves, com pneumonia aparente, febre, sepse e, menos comumente, gastroenterite ou sintomas neurológicos [99]. Se necessário para o manejo de caso, os pacientes também devem ser testados para outros patógenos, conforme recomendado nas diretrizes de manejo clínico local, mas isso nunca deve atrasar o teste para SARS-CoV-2 [99, 100]. Foram relatadas coinfeções de SARS-CoV-2 com outros patógenos, portanto, um teste positivo para outro patógeno não exclui COVID-19 e vice-versa [27, 101-109]. Foram relatados casos de resultados de teste de anticorpos falsos positivos contra dengue usando um teste de diagnóstico rápido de dengue (RDT) em pacientes com COVID-19 [110, 111]. Há também o risco de resultados falso-positivos ou falso-negativos para SARS-CoV-2, se o teste não for realizado com os ensaios adequados ou se não for realizado em condições adequadas.

Coleta de amostras, transporte e armazenamento

Procedimentos de segurança durante a coleta de amostras

Deve ser assegurado que os profissionais de saúde que coletam amostras clínicas de casos suspeitos cumpram rigorosamente as diretrizes de prevenção e controle de infecção (IPC) e usem equipamento de proteção individual (EPI) adequado, consulte também a guia provisória da OMS para COVID-19 sobre [prevenção e controle de infecções durante a assistência médica](#) [7].

Deve ser certificado que os procedimentos operacionais padrão (POP) adequados estejam em vigor e que a equipe seja devidamente treinada na coleta, embalagem, envio e armazenamento de amostras. Deve-se presumir que todas as amostras coletadas para investigações podem estar infectadas com SARS-CoV-2 e outros patógenos. Consulte também as guias provisórias da OMS sobre [biossegurança laboratorial](#) para SARS-CoV-2 [3]. As diretrizes locais, incluindo o consentimento informado, devem ser seguidas para a coleta de amostras, teste, armazenamento e pesquisa.

Amostras a serem coletadas

A amostra ideal depende da apresentação clínica e do tempo desde o início dos sintomas. No mínimo, as amostras respiratórias devem ser coletadas

Amostras respiratórias

- **Amostras respiratórias do trato superior** são adequadas para testar infecções em estágio inicial, especialmente em casos assintomáticos ou leves. A utilização de swabs nasofaríngeos e orofaríngeos combinados para teste demonstrou aumentar a sensibilidade da detecção de vírus respiratórios e melhorar a confiabilidade do resultado [60, 86, 112-114]. Dois swabs individuais podem ser combinados em um tubo de coleta ou um swab nasofaríngeo e orofaríngeo combinado pode ser obtido [115]. Alguns estudos mostraram que os esfregaços nasofaríngeos individuais produzem um resultado mais confiável do que os esfregaços orofaríngeos [40, 75, 76, 114].
- **Amostras respiratórias do trato inferior** são aconselhadas se coletadas posteriormente no curso da doença COVID-19 ou em pacientes com uma amostra do trato respiratório superior negativa e houver uma forte suspeita clínica de COVID-19 [70, 71, 75, 76, 86]. As amostras do trato respiratório inferior podem consistir em escarro, se produzido espontaneamente (expectoração induzida não é recomendada, pois apresenta um risco aumentado de transmissão por aerossol [99]) e/ou aspirado endotraqueal ou lavagem broncoalveolar em pacientes com doença respiratória mais grave. Deve-se ter cuidado devido ao alto risco de aerossolização; portanto, é necessária a adesão estrita aos procedimentos de IPC durante a coleta de amostras. A indicação de um procedimento invasivo deve ser avaliada por um médico.

Antes de implementar outros métodos de amostragem de fluido respiratório ou oral, o método de amostragem deve primeiro passar por uma validação laboratorial para os grupos de pacientes pretendidos.

Coleta de amostras simplificada e otimizada

Há uma grande demanda por coleta simplificada e otimizada de amostras para detecção de SARS-CoV-2. Estudos com swabs orofaríngeos e nasofaríngeo/nasal combinados [116, 117], outros em midturbinate [118-120] ou swabs nasais ou narinas inferiores [120, 121] ou swab lingual [120] por um profissional treinado ou por auto-coleta foram realizados. Embora alguns desses estudos mostrem que essas abordagens funcionam razoavelmente bem, esses estudos se concentram principalmente em grupos de pacientes específicos e seus tamanhos de amostra são limitados. Antes que a ampla implementação dessas alternativas possa ser recomendada, avaliação e validação adicionais são necessárias para determinar as indicações para as quais esses métodos de coleta servem como alternativas apropriadas.

Há casos específicos em que a coleta de swabs nasofaríngeos e orofaríngeos pode ser problemática, como a triagem em massa em escolas ou casas de repouso, especialmente quando idosos com demência ou crianças pequenas estão envolvidos. Nessas situações, os fluidos orais podem ser potencialmente uma amostra adequada, pois os métodos de coleta são menos invasivos e há um risco menor de exposição de outros na coleta, em comparação com a coleta de amostras do trato respiratório superior.

Os métodos de coleta de fluido oral variam amplamente: desde fluidos orofaríngeos posteriores / saliva coletados por cuspe ou salivação, ou coleta de fluido oral com pipeta ou esponjas especiais. O gargarejo com soluções salinas é outra alternativa estudada. A sensibilidade dessas amostras tem uma ampla faixa de desempenho em comparação com a amostragem naso e/ou orofaríngea [28, 49, 82, 83, 85-88, 122-125]. Devido à grande variedade de métodos de coleta e etapas de processamento, os laboratórios devem coletar seus próprios dados de desempenho vinculados ao método local de coleta e na população relevante para teste. No momento, a OMS não recomenda o uso de saliva como o único tipo de amostra para diagnósticos clínicos de rotina. Se os métodos de coleta diferente do padrão forem usados para diagnosticar outros patógenos respiratórios, a detecção desses patógenos deve fazer parte do procedimento de validação.

Amostra fecal

A partir da segunda semana após o início dos sintomas, o NAAT pode ser considerado para amostras fecais nos casos em que amostras do trato respiratório superior e inferior são negativas e a suspeita clínica de infecção por COVID-19 permanece [126]. Ao testar as fezes, deve ser certificado que o método de extração pretendido e o NAAT foram validados para este tipo de amostra.

Amostras post-mortem

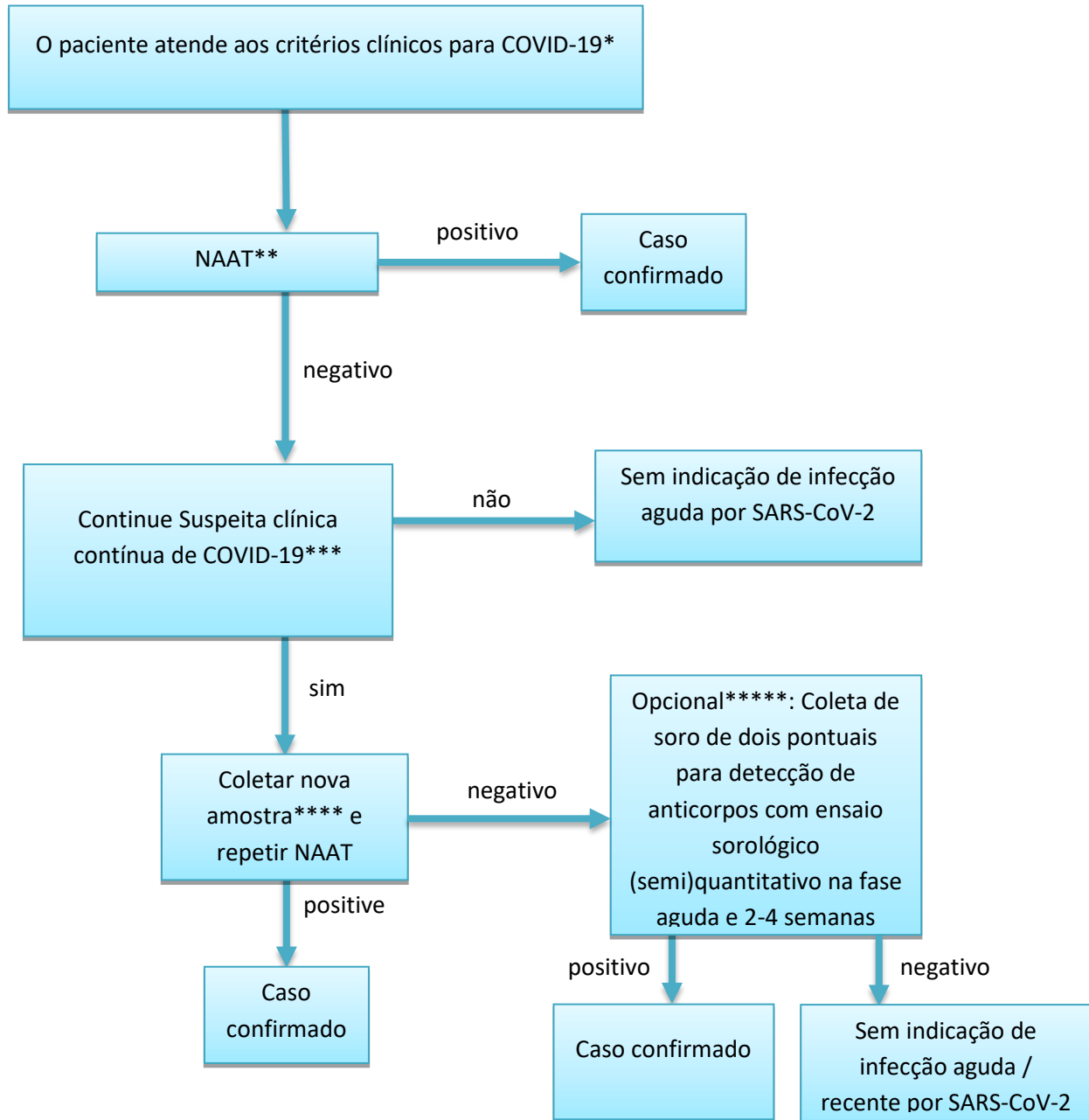
No caso de falecidos, um swab post-mortem, biópsia com agulha ou amostras de tecido da autópsia, incluindo tecido pulmonar para testes patológicos e microbiológicos adicionais devem ser considerados [127-133].

Amostras de soro

Se resultados negativos de NAAT forem obtidos para um paciente em que há forte suspeita de infecção por SARS-CoV-2, uma amostra pareada de soro pode ser coletada. Uma amostra colhida na fase aguda e outra na fase de convalescente 2-4 semanas depois pode ser usada para verificar soroconversão ou aumento nos títulos de anticorpos. Essas duas amostras podem ser usadas retrospectivamente para determinar se o indivíduo teve COVID-19, especialmente quando a infecção não pôde ser detectada por NAAT.

Ver Figure 1 para o algoritmo de diagnóstico para casos que requerem cuidados clínicos e são suspeitos de ter COVID-19.

Figura 1: Diagrama de fluxo de diagnóstico para a detecção de infecção aguda por SARS-CoV-2 em indivíduos com suspeita clínica de COVID-19



* Manejo clínico de COVID-19 (Guia Provisória), Organização Mundial da Saúde [99].

** Se a detecção de antígeno for incorporada ao algoritmo de teste, como isso precisa ser feito depende da sensibilidade e especificidade do teste de antígeno e da prevalência de infecção por SARS-CoV-2 na população de teste pretendida. Para obter mais informações, consultar a seção abaixo sobre "Testes de diagnóstico rápido baseado na detecção de antígenos" e orientações específicas [Orientação provisória sobre a detecção de antígeno no diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 usando imunoenaios rápidos](#) [5].

*** Uma suspeita clínica contínua pode ser, por exemplo, a ausência de outra etiologia óbvia, a presença de uma ligação epidemiológica ou achado clínico sugestivo (por exemplo, sinais radiológicos típicos).

**** A seleção do tipo de amostra dependerá da apresentação clínica, consultar a seção "Amostras a serem coletadas". O aumento do número de amostras testadas também aumentará a sensibilidade do teste para COVID-19. Mais de duas amostras podem ser necessárias em algumas ocasiões para detectar SARS-CoV-2 [73].

***** Para a interpretação da sorologia, consulte a seção "Implementação e interpretação de testes de anticorpos em laboratório clínico". A sorologia não pode ser usada como um diagnóstico independente para infecções agudas por SARS-CoV-2 e manejo clínico.

Embalagem e transporte de amostras clínicas

As amostras para detecção viral devem chegar ao laboratório o mais rápido possível após a coleta. O manuseio correto das amostras durante o transporte e no laboratório é essencial. Para obter mais orientações, consultar Anexo 1.

O transporte de amostras dentro das fronteiras nacionais deve ser em conformidade com os regulamentos nacionais aplicáveis. O transporte internacional de amostras que podem conter SARS-CoV-2 deve seguir os Regulamentos de Modelo das Nações Unidas, Substância Biológica, Categoria B (UN 3373) e quaisquer outros regulamentos aplicáveis, dependendo do modo de transporte.

Maiores informações podem ser encontradas em [Guia da OMS de regulamento para o transporte de substâncias infecciosas 2019-2020](#) [134] e específico para SARS-CoV-2 [Guia de biossegurança laboratorial](#) [3] e [instruções de transporte](#) [135].

Devem ser mantidas linhas de comunicação abertas e eficientes com o laboratório e fornecer todas as informações solicitadas. As amostras devem ser rotuladas corretamente e acompanhadas por um formulário de solicitação de diagnóstico (consultar Anexo 2 para um modelo de formulário de solicitação, incluindo informações clínicas mínimas exigidas). Alertar o laboratório antes de enviar as amostras e fornecer as informações básicas essenciais com a solicitação de diagnóstico permite o processamento adequado e oportuno das amostras e o relatório dos resultados.

Práticas de biossegurança em laboratório

Os laboratórios que realizam testes para SARS-CoV-2 devem aderir estritamente às práticas de biossegurança apropriadas. Os testes de amostras clínicas que podem conter SARS-CoV-2 devem ser realizados em laboratórios devidamente equipados por pessoal treinado nos procedimentos técnicos e de biossegurança relevantes. As diretrizes nacionais sobre biossegurança laboratorial devem ser seguidas em todas as circunstâncias. O manuseio de amostras para testes moleculares usando rRT-PCR padrão requer nível de biossegurança (NBS) 2 ou instalações equivalentes com o uso de uma cabine de biossegurança (CBS) ou um dispositivo de contenção primário recomendado para manipulação de amostra antes da inativação.

Tentativas de isolar o vírus em cultura de células requerem, no mínimo, instalações NBS-3. Ao realizar cultura viral de amostras clínicas potencialmente positivas para SARS-CoV-2 para outros fins, uma avaliação de risco deve ser realizada, seguida por medidas e procedimentos de biossegurança requeridos [136].

Considerações específicas dos requisitos de biossegurança podem permitir que certos testes no ponto de atendimento ou sejam realizados fora de um gabinete de biossegurança, uma vez que os regulamentos locais tenham sido revisados, após realizar uma avaliação de risco e colocar em prática medidas adequadas de mitigação de risco. Para obter mais detalhes sobre biossegurança laboratorial, consultar a [guia provisória de biossegurança laboratorial](#) [3]. Para orientações gerais de biossegurança laboratorial, consultar o [Manual de biossegurança Laboratorial da OMS](#), 3ª edição [136].

Testes para SARS-CoV-2

Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAAT)

Sempre que possível, as suspeitas de infecções ativas por SARS-CoV-2 devem ser testadas com NAAT, como rRT-PCR. Os ensaios NAAT devem ter como alvo o genoma SARS-CoV-2. Uma vez que atualmente não há circulação conhecida de SARS-CoV-1 globalmente, uma sequência específica de sarbecovírus também é um alvo aceitável. Para ensaios comerciais, a interpretação dos resultados deve ser feita de acordo com as instruções de uso. O diagnóstico ideal consiste em um ensaio NAAT com pelo menos dois alvos independentes no genoma SARS-CoV-2, no entanto, em áreas com transmissão generalizada de SARS-CoV-2, um algoritmo simples pode ser adotado com um único alvo discriminatório. Ao usar ensaio de um alvo, é recomendável ter uma estratégia para monitorar as mutações que podem afetar o desempenho. Para obter mais detalhes, consultar a seção abaixo em “Informações básicas sobre o monitoramento de mutações nas regiões de iniciadores e sonda”.

Informações básicas sobre o monitoramento de mutações nas regiões de iniciadores e sonda

Como o SARS-CoV-2 continua a mudar geneticamente ao longo do tempo, divergência entre os iniciadores e/ou sondas e as regiões de ligação correspondentes nos genomas do SARS-CoV-2 podem reduzir a sensibilidade do NAAT. Quando viável, o monitoramento de divergências de primer e sonda devido a mutações no SARS-CoV-2 e avaliação do seu impacto é recomendado. Ao testar rotineiramente todas as amostras com dois conjuntos diferentes de iniciadores/sonda que têm como alvo diferentes regiões genômicas, é possível reduzir o risco de resultados falso-negativos. Várias ferramentas de monitoramento de mutações relevantes estão disponíveis, incluindo pesquisas no [GISAID](#) (the Global Initiative on Sharing All Influenza Data) e outras ferramentas incluindo [PrimerCheck](#) (Erasmus Medical Centre), [PrimerScan](#) (European Centre for Disease prevention and Control) e [CoV-GLUE](#) (COVID-19 UK Genomics Consortium and MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research). O Primercheck e o COV-GLUE permitem aos pesquisadores usar seus próprios dados de sequência confidencialmente. Nem todas as mutações nas regiões de iniciador/sonda levam a mudanças significativas no desempenho. As previsões *in silico* da eficiência da ligação são insuficientes para quantificar o efeito de uma divergência na sensibilidade de um NAAT, por isso é essencial fazer uma comparação experimental da sensibilidade do teste para ambos, os isolados virais variantes e os de referência. Para ensaios comerciais, é vital manter o controle de possíveis incidentes de desempenho abaixo do ideal. Por favor, informe o fabricante do ensaio e a OMS sobre quaisquer preocupações que você possa ter com um ensaio específico.

Muitos ensaios rRT-PCR comerciais e *in-house* estão disponíveis e vários foram validados independentemente [137-143]. Algumas considerações para selecionar o NAAT certo para o laboratório estão listadas no Anexo 3. Alguns dos sistemas NAAT têm a capacidade de testes totalmente automatizados que integram o processamento de amostras, bem como a capacidade de extração, amplificação e relatórios de RNA. Esses sistemas fornecem acesso a testes em locais com capacidade laboratorial limitada e tempo de resposta rápido quando usados para testes do paciente no atendimento. Os dados de validação de alguns desses ensaios estão agora disponíveis [144]. Ao implementar esses ensaios em ambientes específicos, a equipe que realiza o teste deve ser adequadamente treinada, o desempenho deve ser avaliado nesses ambientes específicos e um sistema para monitorar a qualidade deve ser implementado. Métodos adicionais de amplificação/detecção potencialmente valiosos, como CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), tecnologias de amplificação de ácido nucleico isotérmico (por exemplo, amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP), e ensaios de microarray molecular estão em desenvolvimento ou em o processo de ser comercializado [145-147]. A validação do desempenho analítico e clínico desses ensaios, a demonstração de sua utilidade operacional potencial, o compartilhamento rápido de dados, bem como a revisão regulatória de emergência de testes manufaturados e de bom desempenho são incentivados para aumentar o acesso a testes para SARS-CoV-2.

É necessária uma interpretação cuidadosa dos resultados positivos fracos com NAAT, uma vez que alguns dos ensaios mostraram produzir sinais falsos com valores de Ct elevados. Quando os resultados do teste são inválidos ou questionáveis, nova amostra do paciente deve ser coletada e testada. Se não houver amostras adicionais do paciente disponíveis, o RNA deve ser extraído novamente das amostras originais e testado novamente por uma equipe altamente experiente. Os resultados podem ser confirmados por um teste NAAT alternativo ou por sequenciamento do vírus se a carga viral for suficientemente alta. Os laboratórios são estimulados a buscar confirmação do laboratório de referência de quaisquer resultados inesperados.

Um ou mais resultados negativos não excluem necessariamente a infecção por SARS-CoV-2 [40, 42, 58, 66-74]. Uma série de fatores pode levar a um resultado negativo em um indivíduo infectado, incluindo:

- Baixa qualidade da amostra porque contém muito pouco material do paciente;
- Amostra coletada no final do curso da doença, ou amostra retirada de uma parte do corpo que não continha o vírus naquele momento;
- Amostra não manuseada e/ou transportada apropriadamente;
- Razões técnicas inerentes do teste, por ex. inibição da PCR ou mutação viral.

Para manejo de caso clínico, um algoritmo de teste proposto está ilustrado na Figura 1.

Alternativas para extração de RNA

A maioria dos fluxos de trabalho convencionais para diagnóstico molecular requer extração de RNA antes que um rRT-PCR seja realizado. No entanto, há uma escassez global de kits de extração comercial devido à pandemia de COVID-19. A rRT-PCR direta de swabs nasofaríngeos pode fornecer uma alternativa temporária ou emergencial à extração de RNA, mas as limitações da quantidade de volume, assim como um risco aumentado de degradação do RNA e inibição da PCR podem levar a uma perda de sensibilidade do ensaio [148, 149]. O tratamento térmico antes do processamento da amostra pode afetar a qualidade do RNA [149, 150]. Outros fatores que podem afetar a qualidade do RNA e que devem ser avaliados antes da implementação são a adição de detergentes, meios de transporte, volume da amostra usada e enzima polimerase usada [148, 151-154]. As implicações de biossegurança no fluxos de trabalho de extrações alternativas também devem ser consideradas. Os laboratórios considerando métodos alternativos que contornam a necessidade de extração de RNA devem validar completamente seus protocolos e realizar uma avaliação de risco que pondere os riscos e benefícios, antes de integrar tais protocolos ao fluxo de trabalho de diagnóstico

Pool de amostras para NAAT

O agrupamento de amostras de vários indivíduos pode aumentar a capacidade diagnóstica para detectar SARS-CoV-2 quando a taxa de teste não atende à demanda em alguns ambientes [155-159]. Existem várias estratégias para agrupar amostras. Se o resultado do pool for negativo, todas as amostras individuais no pool são consideradas negativas. Se o teste do pool for positivo, as etapas de acompanhamento dependem da estratégia, mas em geral cada amostra precisa ser testada individualmente (segregação do pool) para identificar a(s) amostra(s) positiva(s). Outra abordagem é o agrupamento de matrizes. Isso significa que os pools são feitos por linha e por coluna, e testados por PCR, a posição na matriz identifica a amostra positiva sem testes adicionais se a prevalência for suficientemente baixa. Dependendo da robustez do método de teste de matriz no contexto específico, ainda pode ser aconselhável testar novamente as amostras positivas identificadas para confirmação. Pool de amostras pode ser considerado em grupos populacionais com prevalência esperada baixa/muito baixa de infecção por SARS-CoV-2, mas não para casos ou coortes com maior probabilidade de estarem infectados com SARS-CoV-2. O uso rotineiro de pool de amostras de vários indivíduos em cuidados clínicos e para fins de rastreamento de contato não é recomendado. Estudos têm sido conduzidos para determinar o número ideal de amostras por pool e projetar estratégias de agrupamento em diferentes ambientes de surto [156, 160-162].

Antes que qualquer protocolo para pool de amostra possa ser implementado, eles devem ser validados nas populações e configurações apropriadas. Uma estratégia de teste inadequada pode levar a perda de casos ou outros erros de laboratório que podem, por sua vez, afetar negativamente o manejo do paciente e as medidas de controle de saúde pública. Além disso, o risco de contaminação cruzada e o aumento potencial da complexidade e do volume da carga de trabalho devem ser considerados. Para

realizar um pool confiável, a automação adequada é a chave (por exemplo, sistemas robóticos, software de suporte aos algoritmos para identificar amostras positivas, sistemas de informação de laboratório e middleware que podem funcionar com pools de amostra).

Com base nos dados disponíveis atualmente, pool intra-individual (várias amostras de um mesmo indivíduo que são agrupadas e testadas como uma única amostra) de amostras do trato respiratório superior pode ser usado. O pool intra-individual de escarro e fezes com amostras do trato respiratório superior não é recomendado porque o primeiro pode conter compostos que inibem a rRT-PCR

Testes de diagnóstico rápido com base na detecção de antígenos

Testes de diagnóstico rápido (TDR) que detectam a presença de proteínas virais (antígenos) de SARS-CoV-2 em amostras do trato respiratório estão sendo desenvolvidos e comercializados. A maioria deles são imunoenaios de fluxo lateral (LFI, do inglês *lateral flow immunoassays*), que normalmente são concluídos em 30 minutos. Em contraste com os NAATs, não há amplificação do alvo que é detectado, tornando os testes de antígeno menos sensíveis. Além disso, podem ocorrer resultados falso-positivos (indicando que uma pessoa está infectada quando não está) se os anticorpos na tira do teste também reconhecerem antígenos de vírus diferentes do SARS-CoV-2, tais como outros coronavírus humanos.

A sensibilidade de diferentes TDRs em comparação com rRT-PCR em amostras do trato respiratório superior (swabs nasofaríngeos) parece ser altamente variável [144, 163-165], mas a especificidade é consistentemente relatada como alta. Atualmente, os dados sobre o desempenho do antígeno no ambiente clínico ainda são limitados: NAAT pareado e validações de antígeno em estudos clínicos são encorajados para identificar quais testes de detecção de antígeno que estão em desenvolvimento ou já foram comercializados demonstram desempenho aceitável em estudos de campo representativos. Quando o desempenho é aceitável, os TDRs de antígeno podem ser implementados em um algoritmo de diagnóstico para reduzir o número de testes moleculares que precisam ser realizados e para apoiar a identificação e o manejo rápidos de casos COVID-19. Como a detecção de antígeno seria incorporada ao algoritmo de teste dependerá da sensibilidade e especificidade do teste de antígeno e da prevalência de infecção por SARS-CoV-2 na população pretendida para o teste. Cargas virais mais altas estão associadas a um melhor desempenho no teste de antígeno; portanto, espera-se que o desempenho do teste seja melhor próximo ao início dos sintomas e na fase inicial de uma infecção por SARS-CoV-2. Para obter orientações específicas sobre os testes de detecção de antígenos, consulte [a Guia provisória da OMS sobre a detecção de antígenos no diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 usando imunoenaios rápidos](#) da OMS [5].

Testes sorológicos disponíveis para detecção de anticorpos

Os ensaios sorológicos que detectam anticorpos produzidos pelo corpo humano em resposta à infecção por SARS-CoV-2 podem ser úteis em vários cenários.

Por exemplo, estudos de soropidemiologia podem ser usados para apoiar a investigação de um surto em andamento e para apoiar a avaliação retrospectiva da taxa de ataque ou do tamanho de um surto [9]. Como o SARS-CoV-2 é um novo patógeno, nossa compreensão das respostas de anticorpos gerada ainda está emergindo e, portanto, os testes de detecção de anticorpos devem ser usados com cautela e não para determinar infecções agudas.

Os ensaios não quantitativos (por exemplo, ensaios de fluxo lateral) não podem detectar um aumento nos títulos de anticorpos, em contraste com os ensaios quantitativos ou (semi)quantitativos. Os ensaios de detecção de anticorpos de fluxo lateral (ou outros ensaios não quantitativos) não são atualmente recomendados para diagnóstico agudo e manejo clínico e seu papel em investigações epidemiológicas está sendo estudado. Para obter mais informações sobre a utilidade dos testes de imunodiagnóstico rápidos, consulte o resumo científico da OMS com recomendações sobre os [testes de imunodiagnóstico para SARS-CoV-2 específicos para atendimento primário](#) [4].

A sorologia não deve ser usada como um diagnóstico independente para identificar casos agudos nos cuidados clínicos ou para fins de rastreamento de contato. As interpretações devem ser feitas por um especialista e dependem de vários fatores, incluindo o momento da doença, morbidade clínica, epidemiologia e prevalência dentro do cenário, o tipo de teste usado, o método de validação e a confiabilidade dos resultados.

Foram observadas uma soroconversão (desenvolvimento de resposta mensurável de anticorpos após a infecção) mais robusta e rápida em pacientes com doença grave em comparação com aqueles com sintomatologia mais branda ou infecções assintomáticas. Anticorpos têm sido detectados já no final da primeira semana de infecção em uma fração dos pacientes, mas também podem levar semanas para se desenvolver em pacientes com infecção subclínica/leve [37, 166-173]. Um diagnóstico confiável de infecção por SARS-CoV-2 com base na resposta de anticorpos dos pacientes, muitas vezes, só será possível na fase de recuperação, quando as oportunidades para intervenção clínica ou interrupção da transmissão da doença tiverem passado. Portanto, a sorologia não é um substituto adequado para os ensaios virológicos para corroborar rastreamento de contato ou o manejo clínico. A duração da persistência dos anticorpos gerados em resposta ao SARS-CoV-2 ainda está em estudo [49, 174]. Além disso, a presença de anticorpos que se ligam ao SARS-CoV-2 não garante que sejam anticorpos neutralizantes ou que ofereçam imunidade protetora.

Testes sorológicos disponíveis para detecção de anticorpos

Testes comerciais e não comerciais que medem anticorpos de ligação (imunoglobulinas totais (Ig), IgG, IgM e/ou IgA em diferentes combinações) utilizando várias técnicas, incluindo LFI, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e imunoensaio de quimioluminescência (CLIA, do inglês *chemiluminescence immunoassay*) tornaram-se acessível. Uma série de validações e revisões

sistemáticas sobre esses ensaios foram publicadas [170, 171, 173, 175-177]. O desempenho dos ensaios sorológicos varia amplamente em diferentes grupos de teste (como em pacientes com infecção leve versus moderada a grave, bem como em jovens versus idosos), tempo de teste e proteína viral alvo. Compreender essas variações de desempenho exigirá um estudo mais aprofundado. Os testes de detecção de anticorpos para coronavírus também podem apresentar reação cruzada com outros patógenos, incluindo outros coronavírus humanos, [167, 178-180] ou com condições pré-existentes (por exemplo, gravidez, doenças autoimunes) e, assim, produzir resultados falso-positivos.

Os ensaios de neutralização viral são considerados o teste padrão ouro para detectar a presença de anticorpos funcionais. Esses testes requerem uma equipe altamente qualificada e instalações de cultura NB-3 e, portanto, não são adequados para uso em testes de diagnóstico de rotina.

Implementação e interpretação de testes de anticorpos em laboratório clínico

Ao implementar testes sorológicos em laboratório clínico, é aconselhável uma validação interna ou verificação dos testes específicos. Mesmo que os testes comerciais tenham sido autorizados para uso em emergências, uma verificação interna (ou se exigido pelas autoridades locais uma validação) ainda é necessária. Protocolos e exemplos com sugestões de como fazer isso estão agora disponíveis [170, 171, 181].

Cada teste sorológico é diferente. Com relação aos testes comerciais, siga as instruções de uso do fabricante. Estudos mostram que vários ensaios comerciais medindo IgG ou Ig total tiveram um bom desempenho. A maioria desses estudos não mostrou nenhuma vantagem de IgM sobre IgG, já que IgM não aparece muito antes de IgG [173]. O papel adicional do teste de IgA no diagnóstico de rotina não foi estabelecido. Para a confirmação de uma infecção recente, os soros agudos e convalescentes devem ser testados usando um ensaio validado quantitativo ou (semi)quantitativo. A primeira amostra deve ser coletada durante a fase aguda da doença, e a segunda amostra pelo menos 14 dias após a coleta do soro inicial. Espera-se que os níveis máximos de anticorpos ocorram na terceira/quarta semana após o início dos sintomas. A soroconversão ou um aumento nos títulos de anticorpos em soros pareados ajudará a confirmar se a infecção é recente e/ou aguda. Se o teste da amostra inicial for positivo, esse resultado pode ser devido a uma infecção anterior que não está relacionada à doença atual.

O primeiro caso conhecido de reinfecção com SARS-CoV-2 foi documentado [182]. Apenas informações limitadas estão disponíveis sobre a interpretação dos testes de anticorpos contra SARS-CoV-2 após uma infecção anterior com SARS-CoV-2 e sobre a dinâmica da sorologia para SARS-CoV-2 se ocorrer uma infecção subsequente com outro coronavírus. Nesses dois conjuntos de circunstâncias, a interpretação da sorologia pode ser extremamente desafiadora.

Isolamento Viral

O isolamento viral não é recomendado como procedimento de diagnóstico de rotina. Todos os procedimentos que envolvem o isolamento viral em cultura de células requerem equipe treinada e instalações NB-3. Uma avaliação de risco completa deve ser realizada ao cultivar amostras de pacientes potencialmente com SARS-CoV-2 para outros vírus respiratórios pois tem sido demonstrado que o SARS-CoV-2 cresce em uma variedade de linhas celulares [183].

Sequenciamento genômico para SARS-CoV-2

O sequenciamento genômico para SARS-CoV-2 pode ser usado para investigar a dinâmica de um surto, incluindo mudanças no tamanho de uma epidemia ao longo do tempo, sua propagação espaço-temporal e testes de hipóteses sobre as rotas de transmissão. Além disso, as sequências genômicas podem ser usadas para decidir quais ensaios de diagnóstico, antivirais e vacinas podem ser candidatos adequados para estudo posterior. A análise dos genomas do vírus SARS-CoV-2 pode, portanto, complementar, aumentar e apoiar estratégias para reduzir a carga de doença de COVID-19. No entanto, o custo potencialmente alto e o volume de trabalho necessário para o sequenciamento genômico significa que os laboratórios devem ter clareza sobre os retornos esperados de tal investimento e o que é necessário para maximizar a utilidade de tais dados de sequência genômica. A orientação da OMS sobre o sequenciamento genômico do SARS-CoV-2 está sendo desenvolvida atualmente.

Garantia da Qualidade

Antes de introduzir uma nova metodologia de teste, um novo ensaio, novos lotes de materiais ou uma nova técnica de PCR no laboratório, uma validação ou verificação deve ser realizada para garantir que o sistema de teste do laboratório está funcionando adequadamente.

Para sistemas de PCR manual, cada amostra de NAAT deve incluir controles internos e, idealmente, um controle de coleta de amostra (gene alvo humano). Além disso, controles externos são recomendados para cada execução de teste. Os laboratórios que solicitam seus próprios primers e sondas devem realizar testes de entrada ou validação observando a funcionalidade e contaminantes potenciais [184].

Os laboratórios são incentivados a definir os limites de detecção de seus ensaios e a equipe sênior deve reconhecer como a prevalência da doença altera o valor preditivo dos resultados dos seus testes. Uma vez que o número de casos diminui, o valor preditivo positivo diminuirá, portanto, a interpretação dos testes deve continuar a fazer parte de um esquema de garantia de qualidade

rigoroso, com interpretação baseada em: tempo de amostragem, tipo de amostra, especificações do teste, dados clínicos e dados epidemiológicos.

Os laboratórios devem adotar medidas para reduzir o potencial de resultados falso-positivos por rRT-PCR e ter uma estratégia para o gerenciamento de resultados equivocados. Consulte o Anexo 4 para uma lista de verificação.

Em geral, os laboratórios devem ter um sistema de garantia de qualidade implantado e são incentivados a participar de avaliações externa da qualidade (EQA, do inglês *External Quality Assessment*) ou a realizar comparações de resultados entre laboratórios com um subconjunto de amostras.

A OMS anteriormente recomendou os laboratórios nacionais a garantir o desempenho de qualidade pela confirmação dos resultados dos testes para as primeiras 5 amostras positivas e as primeiras 10 amostras negativas (coletadas de pacientes que se enquadram na definição de caso), encaminhando-as a um dos laboratórios de referência da OMS que fornecem teste confirmatório para SARS-CoV-2. A OMS forneceu apoio aos laboratórios nacionais para facilitar o envio das amostras a um dos laboratórios de referência dedicados. Para obter mais informações, consulte o site da OMS para obter a [lista de laboratórios de referência](#) [185] e as [instruções de envio](#) [135]. Os laboratórios nacionais de referência fortalecidos e o acesso crescente a iniciativas de EQA para SARS-CoV-2 reduzem a necessidade de usar este mecanismo. Se o teste para SARS-CoV-2 ainda não estiver disponível em um país, esforços devem ser feitos para estabelecer a capacidade nacional.

Notificação de casos e resultados de testes

Uma rápida comunicação dos resultados dos testes é importante para o planejamento e elaboração das intervenções de saúde pública e controle de surtos. Os laboratórios devem seguir os requisitos de notificação nacionais. Em geral, todos os resultados dos testes, positivos ou negativos, devem ser imediatamente comunicados às autoridades nacionais. Recordamos aos Estados Membros do Regulamento Sanitário Internacional (RSI) de sua obrigação de compartilhar com a OMS informações relevantes para saúde pública dos eventos de notificação compulsória a OMS, usando o instrumento de decisão no Anexo 2 do RSI (2005) [186].

A interação regular entre especialistas em saúde pública, médicos e especialistas em laboratórios locais para discutir estratégias, potenciais problemas e soluções deve ser considerada uma parte essencial de uma resposta adequada à COVID-19. Esta resposta inclui o desenvolvimento de guias e protocolos de estudos (clínicos, epidemiológicos e de ensaio).

Um tempo de resposta rápido para os resultados de teste pode, por sua vez, ter um impacto positivo no surto [187, 188]. Mais estudos são necessários para ajustar o tempo máximo aceitável desde o início dos sintomas até o resultado da amostra para ter impacto no manejo clínico e no controle do surto; atualmente, um máximo de 24 horas é considerado razoável na maioria das configurações. Como os laboratórios geralmente têm controle apenas sobre o tempo entre a chegada da amostra e o resultado do teste, é fundamental garantir que as amostras cheguem ao laboratório sem demora.

Métodos

Este documento foi desenvolvido por meio de consulta com especialistas da rede de especialistas de laboratório para SARS-CoV-2. Os especialistas da rede completaram um acordo de confidencialidade e uma declaração de interesse. Os formulários de declaração de interesses foram analisados e não foram identificados conflitos em relação ao suporte deste documento de orientação. Orientações relevantes da OMS foram usadas neste documento [136, 185, 189-194]. Esta é a sexta edição (versão 2020.6) e foi originalmente adaptada de *Laboratory testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* [189].

Um amplo espectro de especialistas de laboratórios clínicos de diferentes regiões esteve envolvido no desenvolvimento deste documento. Os especialistas internos envolvidos no desenvolvimento incluem pontos focais de laboratórios regionais da OMS, epidemiologistas e especialistas clínicos. Esta versão da guia incorpora o novo entendimento e as características do vírus e aborda perguntas e questões recebidas dos escritórios regionais e nacionais da OMS e outros canais.

Colaboradores

Grupo diretivo da OMS: Amal Barakat, Céline Barnadas, Silvia Bertagnolio, Caroline Brown, Lisa Carter, Sebastian Cognat, Jane Cunningham, Varja Grabovac, Francis Inbanathan, Kazunobu Kojima, Juliana Leite, Marco Marklewitz, Jairo Mendez-Rico, Karen Nahapetyan, Chris Oxenford, Boris Pavlin, Mark Perkins, Anne Perrocheau, Jose Rovira, Maria Van Kerkhove, Karin von Eije, Joanna Zwetyenga,

Colaboradores externos:

Sarah Hill, Oxford University and Royal Veterinary College, United Kingdom; Maria Zambon, Public Health England, United Kingdom; Corine Geurts van Kessel, Richard Molenkamp and Marion Koopmans, Erasmus MC and Adam Meijer and Chantal Reusken, RIVM, The Netherlands; Antonino Di Caro, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani, Italy; Anne von Gottberg, National Institute for Communicable Diseases, South Africa; Janejai Noppavan, National institute of Health, Thailand; Raymond Lin, National Public Health Laboratory, Singapore; Leo Poon and Malik Peiris, Hong Kong University, China, Hong Kong SAR; George Gao, Chinese CDC, China.

Referências

1. *Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19*. World Health Organization 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331509>.
2. *Laboratory assessment tool for laboratories implementing COVID-19 virus testing*. World Health Organization 2020 8 April 2020 7 July 2020]; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331715>.
3. *Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19)*. World Health Organization 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332076>
4. *Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19*. World Health Organization 8 April 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331713>.
5. *Antigen detection in diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays, interim guidance*. World Health Organization 2020. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334253>
6. *Considerations in the investigation of cases and clusters of COVID-19*. World Health Organization 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331668>.
7. *Public health surveillance for COVID-19: interim guidance*,. 7 August 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/333752>.
8. *Operational considerations for COVID-19 surveillance using GISRS, interim guidance*. World Health Organization 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331589>.
9. *The Unity Studies: Early Investigations Protocols*. 2020 27 July 2020]; Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/early-investigations>.
10. Gorbalenya A, B.S., Baric R, de Groot R, Drosten C, Gulyaeva A, Haagmans B, Lauber C, Leontovich A, Neuman B, Penzar D, Perlman S, Poon L, Samborskiy D, Sidorov I, Sola I, Ziebuhr J, *The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2*. Nat Microbiol, 2020. **5**(4): p. 536-544.
11. *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. 2020 27 July 2020]; Available from: <https://talk.ictvonline.org/>.
12. Naqvi, A.A.T., et al., *Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020. **1866**(10): p. 165878.
13. Yoshimoto, F.K., *The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19*. Protein J, 2020. **39**(3): p. 198-216.
14. Kim, D., et al., *The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome*. Cell, 2020. **181**(4): p. 914-921 e10.
15. Lu, R., et al., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding*. Lancet, 2020. **395**(10224): p. 565-574.
16. Yan, R., et al., *Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2*. Science, 2020. **367**(6485): p. 1444-1448.
17. Ni, W., et al., *Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19*. Crit Care, 2020. **24**(1): p. 422.
18. Wu, Z. and J.M. McGoogan, *Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention*. JAMA, 2020.
19. Mizumoto, K., et al., *Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020*. Euro Surveill, 2020. **25**(10).
20. He, J., et al., *Proportion of asymptomatic coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis*. J Med Virol, 2020.
21. Kronbichler, A., et al., *Asymptomatic patients as a source of COVID-19 infections: A systematic review and meta-analysis*. Int J Infect Dis, 2020.
22. Al-Sadeq, D.W. and G.K. Nasrallah, *The incidence of the novel coronavirus SARS-CoV-2 among asymptomatic patients: a systematic review*. Int J Infect Dis, 2020.
23. Kluytmans-van den Bergh, M.F.Q., et al., *Prevalence and Clinical Presentation of Health Care Workers With Symptoms of Coronavirus Disease 2019 in 2 Dutch Hospitals During an Early Phase of the Pandemic*. JAMA Netw Open, 2020. **3**(5): p. e209673.
24. Gudbjartsson, D.F., et al., *Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic Population*. N Engl J Med, 2020. **382**(24): p. 2302-2315.
25. Arons, M.M., et al., *Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility*. N Engl J Med, 2020.

26. Bitnun, A., et al., *Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection in Toronto children: a second look*. Pediatrics, 2009. **123**(1): p. 97-101.
27. Richardson, S., et al., *Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area*. JAMA, 2020.
28. Wyllie, A.L., et al., *Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2*. N Engl J Med, 2020.
29. WHO. *R&D blueprint and COVID-19*. 2020 [cited 2020 16 July 2020]; Available from: <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19>.
30. CLOPID-R. *Global research collaboration for infectious disease preparedness, preparedness, data sharing*. 2020 16 July 2020]; Available from: <https://www.glopid-r.org/our-work/data-sharing/>.
31. Li, Q., et al., *Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia*. N Engl J Med, 2020. **382**(13): p. 1199-1207.
32. Guan, W.J., et al., *Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China*. N Engl J Med, 2020. **382**(18): p. 1708-1720.
33. Linton, N.M., et al., *Incubation Period and Other Epidemiological Characteristics of 2019 Novel Coronavirus Infections with Right Truncation: A Statistical Analysis of Publicly Available Case Data*. J Clin Med, 2020. **9**(2).
34. Lauer, S.A., et al., *The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application*. Ann Intern Med, 2020. **172**(9): p. 577-582.
35. Backer, J.A., D. Klinkenberg, and J. Wallinga, *Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20-28 January 2020*. Euro Surveill, 2020. **25**(5).
36. He, X., et al., *Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19*. Nat Med, 2020. **26**(5): p. 672-675.
37. Wolfel, R., et al., *Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019*. Nature, 2020.
38. Weiss, A., M. Jellingso, and M.O.A. Sommer, *Spatial and temporal dynamics of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis*. EBioMedicine, 2020. **58**: p. 102916.
39. Sethuraman, N., S.S. Jeremiah, and A. Ryo, *Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2*. JAMA, 2020.
40. Zou, L., et al., *SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients*. N Engl J Med, 2020. **382**(12): p. 1177-1179.
41. Wang, Y., et al., *Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity*. J Clin Invest, 2020.
42. Young, B.E., et al., *Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore*. JAMA, 2020.
43. Kam, K.Q., et al., *A Well Infant with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) with High Viral Load*. Clin Infect Dis, 2020.
44. Hu, Z., et al., *Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China*. Sci China Life Sci, 2020. **63**(5): p. 706-711.
45. Liu, Y., et al., *Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19*. Lancet Infect Dis, 2020.
46. Zheng, S., et al., *Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study*. BMJ, 2020. **369**: p. m1443.
47. Lavezzo, E., et al., *Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'*. Nature, 2020. **Nature**.
48. Agnihothram, S., et al., *Evaluation of serologic and antigenic relationships between middle eastern respiratory syndrome coronavirus and other coronaviruses to develop vaccine platforms for the rapid response to emerging coronaviruses*. J Infect Dis, 2014. **209**(7): p. 995-1006.
49. To, K.K., et al., *Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study*. Lancet Infect Dis, 2020. **20**(5): p. 565-574.
50. Li, N., X. Wang, and T. Lv, *Prolonged SARS-CoV-2 RNA shedding: Not a rare phenomenon*. J Med Virol, 2020.
51. Zhou, B., et al., *The duration of viral shedding of discharged patients with severe COVID-19*. Clin Infect Dis, 2020.
52. Chen, Y., et al., *The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients*. J Med Virol, 2020.
53. Gupta, S., et al., *Persistent viral shedding of SARS-CoV-2 in faeces - a rapid review*. Colorectal Dis, 2020.

54. Xu, K., et al., *Factors associated with prolonged viral RNA shedding in patients with COVID-19*. Clin Infect Dis, 2020.
55. Qi, L., et al., *Factors associated with duration of viral shedding in adults with COVID-19 outside of Wuhan, China: A retrospective cohort study*. Int J Infect Dis, 2020.
56. Lescure, F.X., et al., *Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series*. Lancet Infect Dis, 2020.
57. Ling, Y., et al., *Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients*. Chin Med J (Engl), 2020. **133**(9): p. 1039-1043.
58. Pan, Y., et al., *Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples*. Lancet Infect Dis, 2020. **20**(4): p. 411-412.
59. Xing, Y.H., et al., *Prolonged viral shedding in feces of pediatric patients with coronavirus disease 2019*. J Microbiol Immunol Infect, 2020.
60. Oliver S, O.S.J., Patel M, Patel S, Queen I, Quick N et al, *Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States*. Nat Med, 2020.
61. Jeroen J.A. van Kampen, D.A.M.C.v.d.V., Pieter L.A. Fraaij, Bart L. Haagmans, Mart M. Lamers, Nisreen Okba, Johannes P.C. van den Akker, Henrik Endeman, Diederik A.M.P.J. Gommers, Jan J. Cornelissen, Rogier A.S. Hoek, Menno M. van der Eerden, Dennis A. Hesselink, Herold J. Metselaar, Annelies Verbon, Jurriaan E.M. de Steenwinkel, Georgina I. Aron, Eric C.M. van Gorp, Sander van Boheemen, Jolanda C. Voermans, Charles A.B. Boucher, Richard Molenkamp, Marion P.G. Koopmans, Corine Geurtsvankessel, Annemiek A. van der Eijk, *Shedding of infectious virus in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19): duration and key determinants*. medRxiv preprint, 2020.
62. La Scola, B., et al., *Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2020. **39**(6): p. 1059-1061.
63. Perera, R., et al., *SARS-CoV-2 Virus Culture and Subgenomic RNA for Respiratory Specimens from Patients with Mild Coronavirus Disease*. Emerg Infect Dis, 2020. **26**(11).
64. Singanayagam A, P.M., Charlett A, Lopez Bernal J, Saliba V, Ellis J, Ladhani S, Zambon M, Gopal R, *Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020*. Eurosurveillance, 2020. **25**(32).
65. *Scientific brief: Criteria to release COVID-19 patients from isolation*. World Health Organization 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332451>.
66. Yuan, J., et al., *PCR Assays Turned Positive in 25 Discharged COVID-19 Patients*. Clin Infect Dis, 2020.
67. Tang, X., et al., *Positive RT-PCR tests among discharged COVID-19 patients in Shenzhen, China*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2020: p. 1-2.
68. Ma, H., et al., *A single-center, retrospective study of COVID-19 features in children: a descriptive investigation*. BMC Med, 2020. **18**(1): p. 123.
69. Xiao, A.T., Y.X. Tong, and S. Zhang, *False-negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence*. J Med Virol, 2020.
70. Liu, R., et al., *Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020*. Clin Chim Acta, 2020. **505**: p. 172-175.
71. Winichakoon, P., et al., *Negative Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swabs Do Not Rule Out COVID-19*. J Clin Microbiol, 2020. **58**(5).
72. Li, Y., et al., *Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19*. J Med Virol, 2020.
73. Lee, T.H., et al., *Testing for SARS-CoV-2: Can We Stop at Two?* Clin Infect Dis, 2020.
74. Kucirka, L.M., et al., *Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure*. Ann Intern Med, 2020.
75. Wang, W., et al., *Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens*. JAMA, 2020.
76. Huang, Y., et al., *SARS-CoV-2 Viral Load in Clinical Samples from Critically Ill Patients*. Am J Respir Crit Care Med, 2020. **201**(11): p. 1435-1438.
77. Wong, M.C., et al., *Detection of SARS-CoV-2 RNA in fecal specimens of patients with confirmed COVID-19: A meta-analysis*. J Infect, 2020. **81**(2): p. e31-e38.
78. Chen, W., et al., *Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity*. Emerg Microbes Infect, 2020. **9**(1): p. 469-473.
79. Chen, X., et al., *Detectable serum SARS-CoV-2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 (IL-6) level in critically ill COVID-19 patients*. Clin Infect Dis, 2020.

80. Corman, V.M., et al., *SARS-CoV-2 asymptomatic and symptomatic patients and risk for transfusion transmission*. Transfusion, 2020.
81. Zhang, W., et al., *Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes*. Emerg Microbes Infect, 2020. **9**(1): p. 386-389.
82. Williams, E., et al., *Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2*. J Clin Microbiol, 2020.
83. Pasomsub, E., et al., *Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease-2019 (COVID-19): a cross-sectional study*. Clin Microbiol Infect, 2020.
84. Yang, J.R., et al., *Persistent viral RNA positivity during the recovery period of a patient with SARS-CoV-2 infection*. J Med Virol, 2020.
85. Guo, W.L., et al., *Effect of throat washings on detection of 2019 novel coronavirus*. Clin Infect Dis, 2020.
86. Lai, C.K.C., et al., *Prospective study comparing deep-throat saliva with other respiratory tract specimens in the diagnosis of novel coronavirus disease (COVID-19)*. J Infect Dis, 2020.
87. Azzi, L., et al., *Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2*. Journal of Infection, 2020. **81**.
88. McCormick-Baw, C., et al., *Saliva as an Alternate Specimen Source for Detection of SARS-CoV-2 in Symptomatic Patients Using Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2*. J Clin Microbiol, 2020.
89. Colavita, F., et al., *SARS-CoV-2 Isolation From Ocular Secretions of a Patient With COVID-19 in Italy With Prolonged Viral RNA Detection*. Ann Intern Med, 2020.
90. Xia, J., et al., *Evaluation of coronavirus in tears and conjunctival secretions of patients with SARS-CoV-2 infection*. J Med Virol, 2020.
91. Wu, P., et al., *Characteristics of Ocular Findings of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Hubei Province, China*. JAMA Ophthalmol, 2020.
92. Zhou, Y., et al., *Ocular Findings and Proportion with Conjunctival SARS-COV-2 in COVID-19 Patients*. Ophthalmology, 2020.
93. Zhang, X., et al., *The evidence of SARS-CoV-2 infection on ocular surface*. Ocul Surf, 2020.
94. Cai, J., et al., *A Case Series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features*. Clin Infect Dis, 2020.
95. Nomoto, H., et al., *Cautious handling of urine from moderate to severe COVID-19 patients*. Am J Infect Control, 2020. **48**(8): p. 969-971.
96. Li, D., et al., *Clinical Characteristics and Results of Semen Tests Among Men With Coronavirus Disease 2019*. JAMA Netw Open, 2020. **3**(5): p. e208292.
97. Paniz-Mondolfi, A., et al., *Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)*. J Med Virol, 2020. **92**(7): p. 699-702.
98. Moriguchi, T., et al., *A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2*. Int J Infect Dis, 2020. **94**: p. 55-58.
99. World Health Organization. *Clinical management of COVID-19 (Interim Guidance)* World Health Organization 2020 27 May 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332196>.
100. Bordi, L., et al., *Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020*. Euro Surveill, 2020. **25**(8).
101. Wu, D., et al., *To alert coinfection of COVID-19 and dengue virus in developing countries in the dengue-endemic area*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2020: p. 1.
102. Rodriguez, J.A., et al., *Co-Infection with SARS-COV-2 and Parainfluenza in a young adult patient with pneumonia: Case Report*. IDCases, 2020. **20**: p. e00762.
103. Rawson, T.M., et al., *Bacterial and fungal co-infection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing*. Clin Infect Dis, 2020.
104. Nowak, M.D., et al., *Co-infection in SARS-CoV-2 infected Patients: Where Are Influenza Virus and Rhinovirus/Enterovirus?* J Med Virol, 2020.
105. Wu, D., et al., *Coinfection of Influenza Virus and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-COV-2)*. Pediatr Infect Dis J, 2020. **39**(6): p. e79.
106. Wu, X., et al., *Co-infection with SARS-CoV-2 and Influenza A Virus in Patient with Pneumonia, China*. Emerg Infect Dis, 2020. **26**(6): p. 1324-1326.
107. Khodamoradi, Z., M. Moghadami, and M. Lotfi, *Co-infection of Coronavirus Disease 2019 and Influenza A: A Report from Iran*. Arch Iran Med, 2020. **23**(4): p. 239-243.
108. Azekawa, S., et al., *Co-infection with SARS-CoV-2 and influenza A virus*. IDCases, 2020. **20**: p. e00775.
109. Koehler, P., et al., *COVID-19 associated pulmonary aspergillosis*. Mycoses, 2020.

110. Yan, G., et al., *Covert COVID-19 and false-positive dengue serology in Singapore*. Lancet Infect Dis, 2020. **20**(5): p. 536.
111. Lustig, Y., et al., *Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and Dengue viruses*. Clin Infect Dis, 2020.
112. Hammitt, L.L., et al., *Added value of an oropharyngeal swab in detection of viruses in children hospitalized with lower respiratory tract infection*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(6): p. 2318-20.
113. Ek, P., et al., *A combination of naso- and oropharyngeal swabs improves the diagnostic yield of respiratory viruses in adult emergency department patients*. Infect Dis (Lond), 2019. **51**(4): p. 241-248.
114. Sutjipto s, H.L., Yant TJ, Mendis SM, Abdad MY, Marimuthu K, Ng OT, Lin C, Chan M et al., *The effect of sample site, illness duration and the presence of pneumonia on the detection of SARS-CoV-2 by real-time reverse-transcription PCR*. Open Forum Infectious Diseases, 2020.
115. Lieberman, D., et al., *Pooled nasopharyngeal and oropharyngeal samples for the identification of respiratory viruses in adults*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(6): p. 733-5.
116. Vlek, A.L.M., et al., *Combined throat/nasal swab sampling for SARS-CoV-2 is equivalent to nasopharyngeal sampling*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2020.
117. LeBlanc, J.J., et al., *A combined oropharyngeal/nares swab is a suitable alternative to nasopharyngeal swabs for the detection of SARS-CoV-2*. J Clin Virol, 2020. **128**: p. 104442.
118. Pinninti, S., et al., *Comparing Nasopharyngeal and Mid-Turbinate Nasal Swab Testing for the Identification of SARS-CoV-2*. Clin Infect Dis, 2020.
119. Palmas, G., et al., *Nasal Swab as Preferred Clinical Specimen for COVID-19 Testing in Children*. Pediatr Infect Dis J, 2020. **39**(9): p. e267-e270.
120. Tu, Y.P., et al., *Swabs Collected by Patients or Health Care Workers for SARS-CoV-2 Testing*. N Engl J Med, 2020. **383**(5): p. 494-496.
121. Altamirano, J., et al., *Assessment of Sensitivity and Specificity of Patient-Collected Lower Nasal Specimens for Sudden Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Testing*. JAMA Netw Open, 2020. **3**(6): p. e2012005.
122. Hamid, H., et al., *COVID-19 Pandemic and Role of Human Saliva as a Testing Biofluid in Point-of-Care Technology*. Eur J Dent, 2020.
123. Alizargar, J., et al., *Saliva samples as an alternative for novel coronavirus (COVID-19) diagnosis*. J Formos Med Assoc, 2020.
124. Ceron, J.J., et al., *Use of Saliva for Diagnosis and Monitoring the SARS-CoV-2: A General Perspective*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
125. Chen L, Z.J., Peng J, Li X, Deng X, Shen Z, Guo F, Zhang Q, Zhang Q, Jin Y, Wang L, Wang S *Detection of 2019-nCoV in Saliva and Characterization of Oral Symptoms in COVID-19 Patients*. SSRN, 2020.
126. Ng, S.C., F.K.L. Chan, and P.K.S. Chan, *Screening FMT donors during the COVID-19 pandemic: a protocol for stool SARS-CoV-2 viral quantification*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020. **5**(7): p. 642-643.
127. Tang, J.W., et al., *Quantitative temporal-spatial distribution of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) in post-mortem tissues*. J Med Virol, 2007. **79**(9): p. 1245-53.
128. Nicholls, J.M., et al., *Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome*. Lancet, 2003. **361**(9371): p. 1773-8.
129. Pomara, C., G. Li Volti, and F. Cappello, *COVID-19 Deaths: Are We Sure It Is Pneumonia? Please, Autopsy, Autopsy, Autopsy!* J Clin Med, 2020. **9**(5).
130. Salerno, M., et al., *No Autopsies on COVID-19 Deaths: A Missed Opportunity and the Lockdown of Science*. J Clin Med, 2020. **9**(5).
131. Hanley, B., et al., *Autopsy in suspected COVID-19 cases*. J Clin Pathol, 2020. **73**(5): p. 239-242.
132. Basso, C., et al., *Feasibility of postmortem examination in the era of COVID-19 pandemic: the experience of a Northeast Italy University Hospital*. Virchows Arch, 2020.
133. Tian, S., et al., *Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies*. Mod Pathol, 2020. **33**(6): p. 1007-1014.
134. *WHO Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2019-2020*. World Health Organization 2019; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325884>.
135. *Guidance for laboratories shipping specimens to WHO reference laboratories that provide confirmatory testing for COVID-19 virus*. World Health Organization 2020; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331639>.

136. WHO laboratory biosafety manual, third edition World Health Organization 2004; Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42981>.
137. Corman, V.M., et al., *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR*. Euro Surveill, 2020. **25**(3).
138. LeBlanc, J.J., et al., *Real-time PCR-based SARS-CoV-2 detection in Canadian Laboratories*. J Clin Virol, 2020; p. 104433.
139. FIND. *SARS-COV-2 molecular assay evaluation results 2020*; Available from: <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/molecular-eval-results/>.
140. Uhteg, K., et al., *Comparing the analytical performance of three SARS-CoV-2 molecular diagnostic assays*. J Clin Virol, 2020. **127**: p. 104384.
141. van Kasteren, P.B., et al., *Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19*. J Clin Virol, 2020. **128**: p. 104412.
142. Lowe, C.F., et al., *Detection of low levels of SARS-CoV-2 RNA from nasopharyngeal swabs using three commercial molecular assays*. J Clin Virol, 2020. **128**: p. 104387.
143. Igloi, Z., et al., *Comparison of commercial realtime reverse transcription PCR assays for the detection of SARS-CoV-2*. J Clin Virol, 2020. **129**: p. 104510.
144. Dinnes J, D.J., Adriano A, Berhane S, Davenport C, Dittrich S, Emperador D, Takwoingi Y, Cunningham J, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Taylor-Phillips S, Hooft L, Leeftang MMG, Spijker R, Van den Bruel A. , *Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection*. Cochrane Database of Systematic Reviews 2020(8).
145. Carter, L.J., et al., *Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis*. ACS Cent Sci, 2020. **6**(5): p. 591-605.
146. *Rapid HTA of Alternative Diagnostic Technologies for the Detection of SARS-CoV-2*. 2020; Available from: https://www.hiqa.ie/sites/default/files/2020-05/Rapid_HTA_COVID-19_tests.pdf.
147. Esbin, M.N., et al., *Overcoming the bottleneck to widespread testing: a rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection*. RNA, 2020. **26**(7): p. 771-783.
148. Fomsgaard, A.S. and M.W. Rosenstjerne, *An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 - escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020*. Euro Surveill, 2020. **25**(14).
149. Alcoba-Florez, J., et al., *Fast SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR in preheated nasopharyngeal swab samples*. Int J Infect Dis, 2020. **97**: p. 66-68.
150. Chen, H., et al., *Influence of Different Inactivation Methods on Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA Copy Number*. J Clin Microbiol, 2020. **58**(8).
151. Bentley, D.R., et al., *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*. Nature, 2008. **456**(7218): p. 53-59.
152. Chu, A.W., et al., *Evaluation of simple nucleic acid extraction methods for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal and saliva specimens during global shortage of extraction kits*. J Clin Virol, 2020. **129**: p. 104519.
153. Hasan, M.R., et al., *Detection of SARS-CoV-2 RNA by direct RT-qPCR on nasopharyngeal specimens without extraction of viral RNA*. PLoS One, 2020. **15**(7): p. e0236564.
154. Mancini, F., et al., *Laboratory management for SARS-CoV-2 detection: a user-friendly combination of the heat treatment approach and rt-Real-time PCR testing*. Emerg Microbes Infect, 2020. **9**(1): p. 1393-1396.
155. Yelin, I., et al., *Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi-sample pools*. Clin Infect Dis, 2020.
156. Mallapaty, S., *The mathematical strategy that could transform coronavirus testing*. Nature, 2020.
157. Williams, B.G., *Optimal pooling strategies for laboratory testing*. arXiv, 2010. **1007.4903**: p. 1-3.
158. Khodare, A., et al., *Optimal size of sample pooling for RNA pool testing: An avant-garde for scaling up severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 testing*. Indian J Med Microbiol, 2020. **38**(1): p. 18-23.
159. Abdalhamid, B., et al., *Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS CoV-2 Testing Resources*. Am J Clin Pathol, 2020. **153**(6): p. 715-718.
160. Aragon-Caqueo, D., J. Fernandez-Salinas, and D. Laroze, *Optimization of group size in pool testing strategy for SARS-CoV-2: A simple mathematical model*. J Med Virol, 2020.
161. Pilcher, C.D., D. Westreich, and M.G. Hudgens, *Group Testing for Sars-Cov-2 to Enable Rapid Scale-Up of Testing and Real-Time Surveillance of Incidence*. J Infect Dis, 2020.
162. Ben-Ami, R., et al., *Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 detection*. Clin Microbiol Infect, 2020.

163. Lambert-Niclot, S., et al., *Evaluation of a rapid diagnostic assay for detection of SARS CoV-2 antigen in nasopharyngeal swab*. J Clin Microbiol, 2020.
164. Mertens, P., et al., *Development and Potential Usefulness of the COVID-19 Ag Respi-Strip Diagnostic Assay in a Pandemic Context*. Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 225.
165. Porte, L., et al., *Evaluation of novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples*. Int J Infect Dis, 2020.
166. Zhao, J., et al., *Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019*. Clin Infect Dis, 2020.
167. Okba, N.M.A., et al., *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients*. Emerg Infect Dis, 2020. **26**(7).
168. Lou, B., et al., *Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since exposure and post symptom onset*. Eur Respir J, 2020.
169. Zhou, P., et al., *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*. Nature, 2020. **579**(7798): p. 270-273.
170. Dutch National Taksforce serology, R.C., Murk J, van den Beld M, Reimerink J, Kluytmans J, Wegdam M, Zaaier H, van Loo I, Geurts van Kessel C, Koopmans M. . *Report Status of the validation of point-of-care serology tests for SARS-CoV-2 diagnostics: considerations for use*. 15 July 2020; Available from: https://www.nvmm.nl/media/3666/status-validation-poc-ab-tests_20200715_final.pdf.
171. Dutch National Taksforce serology, R.C., Murk J, van den Beld M, Reimerink J, Kluytmans J, Wegdam M, Zaaier H, van Loo I, Geurts van Kessel C, Koopmans M. *Report Status of the validation of ELISA and auto-analyser antibody tests for SARS-CoV-2 diagnostics: considerations for use*. 15 July 2020; Available from: https://www.nvmm.nl/media/3667/status-validation-elisa-and-auto-analysers_20200715_final.pdf.
172. Fafi-Kremer, S., et al., *Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France*. EBioMedicine, 2020: p. 102915.
173. Deeks J, D.J., Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Philips et al. , *Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2*. Cochrane Library, 2020.
174. Jeffrey Seow, C.G., Blair Merrick, Sam Acors, Kathryn J.A. Steel and K.J.D. 10 Malim1, *Longitudinal evaluation and decline of antibody responses in SARS-CoV-2 infection*. medrxiv 2020.
175. Caini, S., et al., *Meta-analysis of diagnostic performance of serological tests for SARS-CoV-2 antibodies up to 25 April 2020 and public health implications*. Euro Surveill, 2020. **25**(23).
176. Lisboa Bastos, M., et al., *Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis*. BMJ, 2020. **370**: p. m2516.
177. GeurtsvanKessel, C.H., et al., *An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 3436.
178. Che, X.Y., et al., *Antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus and human coronaviruses 229E and OC43*. J Infect Dis, 2005. **191**(12): p. 2033-7.
179. Meyer, B., C. Drosten, and M.A. Muller, *Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls*. Virus Res, 2014. **194**: p. 175-83.
180. Gorse, G.J., M.M. Donovan, and G.B. Patel, *Antibodies to coronaviruses are higher in older compared with younger adults and binding antibodies are more sensitive than neutralizing antibodies in identifying coronavirus-associated illnesses*. J Med Virol, 2020. **92**(5): p. 512-517.
181. Theel E, F.L., Palavecino, E et al. , *Verification procedure for commercial serologic tests with Emergency Use Authorization for detection of antibodies to SARS-CoV-2*. American society for microbiology, 2020.
182. To, K.K., et al., *COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing*. Clin Infect Dis, 2020.
183. Hin Chu, J.F.-W.C., Terrence Tsz-Tai Yuen, Huiping Shuai, Shuofeng Yuan, Yixin Wang, et al, *Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study*. The Lancet Microbe, 2020. **Volume 1**(ISSUE 1): p. e14-e23.
184. Mogling, R., et al., *Delayed Laboratory Response to COVID-19 Caused by Molecular Diagnostic Contamination*. Emerg Infect Dis, 2020. **26**(8).
185. *WHO reference laboratories providing confirmatory testing for COVID-19*. World Health Organization 2020 Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/who-reference-laboratories-providing-confirmatory-testing-for-covid-19>.

186. World Health Organization. *International Health Regulations (2005), third edition*. . World Health Organization 2016; Available from: <http://www.who.int/ihr/publications/9789241580496/en/>.
187. Daniel B Larremore, B.W., Evan Lester, Soraya Shehata, James M Burke, James A Hay, Milind Tambe, Michael J Mina, Roy Parker, *Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 surveillance*. Medrxiv preprint, 2020.
188. Kretzschmar, M.E., et al., *Impact of delays on effectiveness of contact tracing strategies for COVID-19: a modelling study*. Lancet Public Health, 2020. **5**(8): p. e452-e459.
189. *Laboratory testing for Middle East Respiratory Syndrome coronavirus, interim guidance (revised)*. World Health Organization, 2019.
190. *WHO Global Influenza Surveillance Network Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*. World Health Organization, 2011.
191. *WHO Recommended Surveillance Standards WHO/CDS/CSR/ISR/99.2*. World Health Organization, 1999.
192. *Guideline for the collection of clinical specimens during field investigation of outbreaks WHO/CDS/CSR/EDC/200.4* World Health Organization, 2000.
193. *Managing epidemics, key facts about major deadly diseases*. . World Health Organization, 2018.
194. *Protocol to investigate non-seasonal influenza and other emerging acute respiratory diseases*. World Health Organization, 2018.
195. Rodino, K.G., et al., *Evaluation of Saline, Phosphate-Buffered Saline, and Minimum Essential Medium as Potential Alternatives to Viral Transport Media for SARS-CoV-2 Testing*. J Clin Microbiol, 2020. **58**(6).
196. Poon, P.c.L., *Evaluation of swabs, transport media and specimen transport conditions for the detection of COVID-19 virus by RT-PCR*. University of Hong Kong, 2020.
197. Rogers, A.A., et al., *Evaluation of Transport Media and Specimen Transport Conditions for the Detection of SARS-CoV-2 Using Real Time Reverse Transcription PCR*. J Clin Microbiol, 2020.
198. Radbel, J., et al., *Detection of SARS-CoV-2 is comparable in clinical samples preserved in saline or viral transport media*. J Mol Diagn, 2020.

A OMS continua monitorando a situação de perto em busca de qualquer mudança que possa afetar esta orientação provisória. Se algum fator mudar, a OMS publicará uma nova atualização. Caso contrário, esta orientação provisória expirará 1 ano após a data de publicação.

© Organização Pan-Americana da Saúde, 2020. Alguns direitos reservados. Este trabalho é disponibilizado sob licença [CC BY-NC-SA 3.0 IGO](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).

Número de referência: [OPAS-W/BRA/PHE/COVID-19/20-129](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=129&Itemid=129)

Anexo 1: Coleta de amostra e transporte

Tipo de Amostra	Materiais para coleta	Temperatura recomendada para armazenamento e/ou transporte ao laboratório ou até o momento de teste (a partir da data de coleta de amostra) #
Swab nasofaríngeo e orofaríngeo	Swabs flocado de poliéster ou dacron com (meio de transporte viral) MTV *	2-8 °C se ≤12 dias* -70 °C (gelo seco) se > 12 dias
Lavagem broncoalveolar	Coletor estéril com MTV **	2-8 °C se ≤ 2 dias -70 °C (gelo seco) se > 2 dias
Aspirado (endo)traqueal, lavagem/aspirado nasofaríngeo ou nasal	Coletor estéril com MTV**	2-8 °C se ≤2 dias -70 °C (gelo seco) se > 2 dias
Escarro	Coletor estéril	2-8 °C se ≤ 2 dias -70 °C (gelo seco) se > 2 dias
Tecido de biópsia ou autópsia, incluindo pulmão	Coletor estéril com solução salina ou MTV	2-8 °C se ≤ 24 hours -70 °C (gelo seco) se > 24 hours
Soro	Tubo coletor com gel separador (adultos: coletar 3-5 ml de sangue total)	2-8 °C se ≤ 5 dias -70 °C (gelo seco) se > 5 dias
Sangue total	Tubo coletor	2-8 °C se ≤5 dias -70 °C (gelo seco) se > 5 dias
Fezes	Container para fezes	2-8 °C se ≤5 dias -70 °C (gelo seco) se > 5 dias

Evitar congelamento e descongelamento repetido das amostras. Se não houver acesso a -70 °C, considerar armazenar a -20 °C.

* Para o transporte de amostras para detecção viral, usar preferencialmente meio de transporte viral (MTV) contendo suplementos antifúngicos e antibióticos. Se o MTV não estiver disponível, outras soluções podem ser usadas após a validação. Essa solução pode incluir solução salina tamponada com fosfato (PBS), solução salina estéril a 0,9%, meio essencial mínimo (com armazenamento a + 4C até 7 a 14 dias) [195-197]. No caso de outros vírus, como influenza, também precisarem ser testados, não armazene as amostras por mais de 5 dias a 4-8 graus, mas a -70 °C ou gelo seco [194].

** Se MTV não estiver disponível, solução salina estéril pode ser usada [198]. A duração do armazenamento da amostra a 2-8 °C pode ser diferente da indicada acima.

Além dos materiais de coleta específicos indicados na tabela, certificar que outros materiais e equipamentos estejam disponíveis: por ex. recipientes de transporte e sacos e embalagens de coleta de amostras, refrigeradores e bolsas frias ou gelo seco, equipamento de coleta de sangue esterilizado (por exemplo, agulhas, seringas e tubos), rótulos e marcadores permanentes, EPI, materiais para descontaminação de superfícies, etc.

Anexo 2: Formulário de pedido laboratorial

FORMULÁRIO DE REQUISIÇÃO DE TESTE LABORATORIAL PARA SARS-CoV-2

Informação do remetente			
NOME DO HOSPITAL, LABORATÓRIO ou OUTRA INSTITUIÇÃO REMETENTE *			
Médico			
Endereço			
Número de telefone			
Definição de caso ¹ :	<input type="checkbox"/> Caso suspeito <input type="checkbox"/> Caso provável <input type="checkbox"/> Outro:		
Informação do Paciente			
Primerio nome		Sobrenome	
Numero ID do paciente		Data de nascimento	Idade:
Endereço		Sexo	<input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> Desconhecido
Numero de telefone			
Informação da Amostra			
Tipo	<input type="checkbox"/> Swab nasofaríngeo e orofaríngeo <input type="checkbox"/> Lavado broncoalveolar <input type="checkbox"/> Aspirado endotraqueal <input type="checkbox"/> Aspirado nasofaríngeo <input type="checkbox"/> Lavado nasal <input type="checkbox"/> Escarro <input type="checkbox"/> Tecido pulmonar <input type="checkbox"/> Soro <input type="checkbox"/> Sangue total <input type="checkbox"/> Fezes <input type="checkbox"/> Outror:		
Todas as amostras coletadas devem ser consideradas potencialmente infecciosas e o laboratório de referência deve ser contactado <u>antes</u> do envio das amostras a eles. Todas as amostras devem ser enviadas de acordo com os requisitos de transporte de Categoria B.			
Marcar a caixa se a amostra clínica for post mortem <input type="checkbox"/>			
Data de coleta		Hora de coleta	
Estatus prioritário			
Detalhes clínicos			
Data do início dos sintomas:			
O paciente tem histórico de viagem recente para uma área afetada?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	País	
		Data de retorno	
O paciente teve contato com um caso confirmado?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Desconhecido <input type="checkbox"/> Outra exposição:		
Comentários adicionais (por exemplo, tratamento antimicrobiano, imunossupressores)			

¹ [Vigilância em saúde pública para COVID-19: guia provisória](#)

Anexo 3: Considerações ao selecionar o NAAT ideal para a configuração de uso

Aspecto	Considera
Qualidade de fabricação	CE-IVD, WHO EUL, PQ, EU-FDA ou outra aprovação. Dados de validação independentes. Fabricação sob ISO.
Alvos	Número de alvos, especificidade para SARS-CoV-2 ou outros sarbecovírus.
Controles	Para o teste NAAT manual, um controle positivo e pelo menos um controle negativo devem ser incluídos. O uso de um controle de extração e um controle de adequação de espécime de gene interno humano também é recomendado
Instrumentação	O ensaio é compatível com os sistemas disponíveis no laboratório ou país? Facilidade de uso e utilidade operacional. Oportunidade de multiplex com outros patógenos respiratórios. Custeio da plataforma e manutenção. Facilidade de acesso ao provedor de manutenção / solução de problemas.
Fluxo de trabalho	O kit pode ser implementado no fluxo de trabalho existente do laboratório, garantindo o mínimo de interrupção em outros diagnósticos?
Facilidade de uso	Complexidade do ensaio. Número de etapas. Treinamento e equipe necessários.
Requerimentos de armazenamento e transporte	Muitos kits requerem cadeia de frio durante o transporte e armazenamento, em algumas circunstâncias, isso pode representar um desafio. Alguns kits contêm enzimas liofilizadas que não exigem que o kit seja enviado e, às vezes, armazenado em frio. Prazo de validade: Pode ser necessário estar preparado para períodos de intensos estoques de teste, um maior prazo de validade é necessário para garantir o uso adequado dos recursos.
Necessidades de treinamento e acesso	Instruções de uso disponíveis, treinamento disponibilizado pela empresa ou outros, fornecimento de opções de solução de problemas e linha de ajuda acessível no idioma local.
Necessidade de reagentes auxiliares	Kit completo para coleta de amostra / extração / amplificação ou o kit PCR requer reagentes ou ferramentas adicionais. Compatibilidade com o método de extração dos laboratórios. Compatibilidade com polimerases disponíveis, se necessário. Equipamento especial necessário (por exemplo, painel de calibração antes de executar o teste, plataformas de extração, bloco de calor, vórtice, suporte magnético ou centrífuga).
Continuidade de abastecimento	Contrato de fornecimento a longo prazo. Rotas de entrega seguras se ocorrerem bloqueios. Custos de ensaio e reagentes auxiliares.

Anexo 4: Sugestões de lista de verificação para reduzir possíveis casos de resultados falsos positivos por rRT-PCR e tratamento de resultados equivocados

Os laboratórios devem ter um procedimento operacional padrão implementado para reduzir os possíveis resultados falsos positivos por rRT-PCR e como lidar com resultados equivocados. Esta lista de verificação fornece sugestões e considerações aos laboratórios. A lista de verificação é formulada para rRT-PCRs manuais, mas muitos aspectos também podem ser usados para outros NAATs.

ADMINISTRATIVO

- Eliminar ou reduzir transcrição
- Se transcrever, método de verificação
- Classificação, alíquota e rotulagem
- Identificadores duplos
- Entrada dos resultados

CONTAMINAÇÃO CRUZADA

- Área de preparação
- Manipulação dos tubos
- Geração de aerossol
- Concentração de ácido nucleico e configuração de extração
- Formatação e etapas de PCR
- Verificar outros positivos na mesma execução
- Ambiental
- Reagentes contaminados
- Descarte

EQUIPAMENTOS e KITS PARA TESTES

- Método de calibração
- Equipamento validado para kit para teste
- Avaliar o risco de contaminação de novos equipamentos

PRÁTICA

- Para triagem em massa, separar os grupos de alta prevalência dos de baixa prevalência.
- Inspeção visual da corrida
- Analítico - exame dos dados brutos
- Estender a corrida quando necessário para Ct tardio

RESULTADOS EQUIVOCADOS

- Seguir as instruções do fabricante
- Política de laboratório para resultados ambíguos
- Quaisquer critérios laboratoriais adicionais para categoria equívoca
- Comunicação da interpretação aos usuários
- Critérios para repetir o teste, se houver
- Uso de teste ou alvo de PCR alternativo
- Comunicação com equipe clínica e de saúde pública