

Diretrizes laboratoriais para detecção e diagnóstico da infecção pelo vírus da varíola do macaco

23 de maio de 2022

Este documento baseia-se na orientação provisória da Organização Mundial da Saúde sobre os testes laboratoriais para o vírus da varíola do macaco, de 23 de maio de 2022, e destina-se a fornecer orientações aos Laboratórios Nacionais de Referência sobre a detecção do vírus da varíola do macaco.

O vírus da varíola do macaco (MPXV, sigla em inglês para *monkeypox virus*) é um vírus de DNA de fita dupla, do gênero *Orthopoxvirus*, pertencente à família *Poxviridae*. Os poxvírus são causadores de doenças em humanos e em muitos outros animais. A infecção geralmente resulta na formação de lesões, nódulos na pele ou erupção cutânea generalizada. Outras espécies patogênicas para os humanos incluem o vírus da *varíola bovina* e o vírus da *varíola* (que causa a varíola humana, que foi erradicada). O vírus *Vaccinia* também é um OPXV, que tem sido usado como vacina atenuada e foi uma ferramenta fundamental na erradicação da varíola, em 1980. Todos os *orthopoxvirus* (OPXV) são antígenicamente relacionados.

O MPXV recebe esse nome devido à detecção inicial em colônias de macacos, embora possa ser encontrado principalmente em roedores. No entanto, o reservatório específico não foi determinado. Além disso, existem dois grupos genéticos (*clados*) conhecidos de MPXV, um endêmico, na África Ocidental, e outro na região da Bacia do Congo.

Após uma incubação, que pode variar de 6 a 16 dias, a apresentação típica da varíola do macaco começa com um curto período prodrômico febril, seguido do desenvolvimento progressivo de uma erupção cutânea clássica com lesões endurecidas e umbilicadas (com depressão central), começando na cabeça ou na face e progredindo para as extremidades e para o tronco. Todas as lesões progridem nos mesmos estágios: máculas, pápulas, vesículas, pústulas e, finalmente, crostas, que secam e caem após duas a quatro semanas. Frequentemente há enantema (feridas ou úlceras nas mucosas) na boca, e as lesões podem afetar os olhos e/ou a região genital.

Devido à variedade de doenças que causam erupções cutâneas e ao fato de que a apresentação clínica pode ser mais atípica neste surto, pode ser difícil diferenciar a varíola do macaco com base apenas na apresentação clínica. Portanto, a decisão de realizar um teste laboratorial deve se basear em fatores clínicos e epidemiológicos, associados a uma avaliação da probabilidade de infecção. Qualquer pessoa que se enquadre na definição de caso suspeito deve fazer um teste.

Considerando a detecção atual de MXP em vários países, qualquer caso que se enquadre na definição de caso suspeito deve ser submetido a testes. Nesse sentido, a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) recomenda que os Estados-Membros garantam a identificação adequada dos casos suspeitos, a coleta de amostras e a implementação de protocolos de detecção molecular, em Laboratórios Nacionais de Referência, de acordo com a capacidade existente. Quando necessário, deve ser considerado o envio de amostras a um Laboratório de Referência nacional ou mundial. Por favor, entre em contato com o Escritório Regional da OPAS para obter orientação sobre os procedimentos.

COLETA E GERENCIAMENTO DE AMOSTRAS

Procedimentos de biossegurança

Deve-se garantir o uso de procedimentos operacionais padrão (POPs) adequados e o pessoal do laboratório deve ser treinado sobre uso adequado dos equipamentos de proteção individual (EPI), incluindo avental descartável impermeável, luvas de látex, óculos de proteção ou cobertura facial completa, touca e propé, bem como seu posterior descarte. Além disso, a equipe deve ser treinada para coleta, armazenamento, embalagem e transporte de amostras.

Gerenciamento do risco biológico

Devem ser tomadas medidas para minimizar o risco de transmissão laboratorial, com base em uma **avaliação do risco na instituição**, ao analisar amostras clínicas de rotina de pacientes suspeitos ou confirmados de varíola do macaco. Isso pode incluir, mas não se limita a, definir um número restrito de funcionários do laboratório que processam as amostras, com experiência e competência comprovadas; usar os EPIs adequados; seguir precauções padrão rigorosamente aplicadas; e evitar procedimentos que possam gerar aerossóis infecciosos.

Os desinfetantes eficazes incluem compostos de quaternário de amônio (0,5% ou 200 ppm) ou desinfetantes à base de cloro (0,5%). Deve-se garantir o cumprimento rigoroso das diretrizes de prevenção e controle de infecções durante a coleta e manuseio de amostras (está sendo desenvolvida a diretriz de manejo clínico e prevenção e controle de infecções).

É recomendável que todos os manuseios de amostras provenientes de casos suspeitos, prováveis ou confirmados de varíola do macaco no laboratório sejam realizados de acordo com uma abordagem baseada no risco. Cada laboratório deve realizar uma avaliação de risco local (ou seja, institucional).

Ao manusear amostras biológicas no laboratório, deve-se cumprir os requisitos básicos de um ambiente de biossegurança nível 2 e devem ser aplicadas medidas de controle reforçadas com base na avaliação de risco local.

A infecção por MPXV pode ocorrer no laboratório, por via respiratória, durante a fase de processamento de amostras de material contaminado ou devido a práticas inadequadas. Portanto, são recomendadas medidas de biossegurança reforçadas, além dos requisitos básicos, incluindo os seguintes, para ensaios de diagnóstico sem disseminação do vírus:

- As amostras de pacientes com suspeita de infecção por MPXV devem ser manuseadas em uma cabine de segurança biológica de classe II revisada (conforme o manual de manutenção de laboratório, OPAS) ou certificada, antes da inativação da amostra. As amostras devidamente inativadas não requerem uma cabine de segurança biológica.
- A equipe do laboratório deve usar os EPIs adequados, especialmente para manusear amostras antes da inativação.
- Quando for necessário o uso de uma centrífuga para um procedimento, devem ser usados recipientes de segurança ou rotores selados.

Devem ser consideradas medidas de controle adicionais para procedimentos específicos, incluindo os procedimentos de formação de aerossóis, conforme a avaliação de risco local. Para obter mais informações sobre requisitos básicos de biossegurança e medidas de controle reforçadas, consulte a quarta edição do Manual de Biossegurança da OMS.

Tipos de amostras

O tipo de amostra recomendado para a confirmação laboratorial da varíola do macaco é o material da lesão cutânea, que inclui:

- Esfregaço da superfície e/ou do exsudato da lesão,
- Bordas superiores de mais de uma lesão (superfície das lesões) ou
- Crostas de lesões.

Os esfregaços de lesões, crostas e fluidos vesiculares não devem ser misturados no mesmo tubo.

Deve-se esfregar vigorosamente a lesão para garantir que seja coletado material suficiente para a obtenção do DNA viral. Os esfregaços podem ser coletados em tubos secos ou em tubos com meios de transporte viral (VTM). Duas lesões do mesmo tipo devem ser coletadas em um único tubo, preferencialmente de locais diferentes do corpo e com aparência diferente.

Além de uma amostra de lesão, é recomendável coletar um esfregaço orofaríngeo. No entanto, os dados sobre a utilidade deste tipo de amostra para o diagnóstico de varíola do macaco são limitados, portanto, uma amostra de esfregaço da garganta negativa deve ser interpretada com cautela.

Como o surto atual ainda está sob investigação, a coleta de outros tipos adicionais de amostras para fins de investigação pode ser considerada, se permitida pelo respectivo conselho de revisão ética e se houver experiência médica e laboratorial suficiente para a coleta, manuseio e armazenamento seguros. Estas podem incluir urina, sêmen, esfregaço retal e/ou genital em indicação baseada na apresentação clínica, incluindo a localização das lesões.

Armazenamento de amostras

As amostras devem ser refrigeradas (2 a 8°C) ou congeladas (-20°C ou menos) dentro do período de uma hora após a coleta. Se demorar mais de 7 dias para as amostras serem analisadas, devem ser armazenadas a -20°C ou menos.

Para o armazenamento de longo prazo de amostras (>60 dias após a coleta), é recomendável a temperatura de -70°C. Ciclos repetidos de congelamento e descongelamento devem ser evitados, pois podem reduzir a qualidade das amostras.

Outros tipos de amostras

O tipo de amostra adicional (não destinada a diagnóstico de rotina e sem a necessidade de coletá-la fora dos ambientes de investigação) são (1) sangue em EDTA, que pode ser usado para apoiar a detecção de MPXV, mas pode não conter um alto nível de vírus como o encontrado em amostras de lesões, pois qualquer viremia ocorre no início do curso da infecção, geralmente no período prodrômico, e antes que as lesões cutâneas se manifestem; (2) biópsia da lesão durante a fase macular, que deve ser considerada apenas se tiver indicação clínica, e realizada somente por pessoal devidamente treinado.

ENVIO DE AMOSTRAS

As amostras devem ser armazenadas refrigeradas ou congeladas dentro do período de uma hora após a coleta e transportadas para o laboratório o mais rápido possível após a coleta. O manuseio e armazenamento corretos das amostras durante o transporte são essenciais para realizar um diagnóstico preciso.

O transporte de amostras deve estar em conformidade com os regulamentos nacionais e/ou internacionais aplicáveis, incluindo o Regulamento Modelo das Nações Unidas, as Recomendações para o Transporte de Produtos Perigosos das Nações Unidas e outros regulamentos aplicáveis, dependendo do modo de transporte utilizado.

Para o transporte internacional por via aérea, as amostras de casos suspeitos, prováveis ou confirmados, de MPXV devem ser transportados como Categoria A, UN2814 “substância infecciosa que afeta os seres humanos”.

Para o transporte das amostras, deve ser utilizado um sistema de embalagem tripla, etiquetagem e documentação adequados. O envio aéreo requer um expedidor certificado no transporte de produtos perigosos. Consulte as [Diretrizes da OMS sobre Regulamentos para o Transporte de Substâncias Infecciosas 2021-2022](#) (disponível apenas em inglês) para obter informações sobre os requisitos de envio de substâncias infecciosas.

Caso o seu país tenha disponível um envio de categoria A, a amostra pode ser inativada e enviada como material isento. O processo de inativação pode ser realizado em Laboratório de Saúde Pública, em um ambiente de biossegurança nível 2. Os protocolos e métodos de inativação sugeridos pela OPAS podem ser encontrados no seguinte link: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-procedures-inactivation-ebola.pdf>

Para enviar amostras completas ou inativadas a laboratórios de referência internacionais, entre em contato com a Equipe de Resposta Laboratorial da OPAS (ricoj@paho.org com cópia para: Laboratoryresponse@paho.org)

TESTES LABORATORIAIS

Os testes para detectar a presença de MPXV devem ser realizados em laboratórios devidamente equipados e por pessoal treinado nos procedimentos técnicos e de biossegurança pertinentes. Devem ser tomadas medidas para minimizar o risco de transmissão no laboratório, com base na avaliação de risco ao analisar amostras clínicas de rotina de pacientes confirmados ou suspeitos de varíola do macaco.

NÃO É RECOMENDADO FAZER ISOLAMENTO VIRAL NA CULTURA

Os países que não têm um protocolo de diagnóstico molecular implementado para a detecção de MPXV devem enviar amostras clínicas suspeitas (definição de caso estritamente precisa) a um laboratório de referência designado pela OPAS. Para obter assistência, entre em contato com a Equipe de Resposta Laboratorial da OPAS (ricoj@paho.org).

Métodos moleculares

A confirmação da infecção por MPXV se baseia em testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT), usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou em tempo real, para a detecção de sequências específicas de DNA viral. A PCR pode ser usada sozinha ou em combinação com o sequenciamento.

Vários grupos de investigação desenvolveram protocolos de PCR validados para a detecção de OPXV e mais especificamente MPXV, alguns dos quais incluem a diferenciação dos clados da Bacia do Congo e da África Ocidental.

Alguns protocolos envolvem dois passos, nos quais a primeira reação de PCR detecta o gênero OPXV, mas não identifica a espécie. Este pode ser seguido por um segundo passo, que pode se basear em PCR ou usar sequenciamento para identificar especificamente MPXV (ver Algoritmo 1 abaixo), além de informações genômicas adicionais. Outros protocolos (recomendados) baseiam-se na detecção inicial genérica de MXPV (confirmando a etiologia), seguida por ensaios de PCR adicionais para a diferenciação dos clados (ver Algoritmo 2 abaixo).

Os kits de PCR que detectam o OPXV ou especificamente o MPXV estão em desenvolvimento; os kits comerciais validados para PCR não estão amplamente disponíveis.

Extração de DNA

O DNA pode ser extraído das amostras anteriormente mencionadas usando qualquer protocolo de extração padrão ou kits comerciais. Em geral, a etapa de lise da amostra na extração de DNA inativa qualquer vírus vivo. Para a extração a partir de crostas da lesão, deve ser utilizado um kit de extração de DNA para tecidos, garantido uma lise adequada da amostra.

Detecção molecular

A OPAS está trabalhando para apoiar todos os Estados-Membros, por meio de laboratórios nacionais de referência, para a implementação da capacidade de realizar testes moleculares para MPXV.

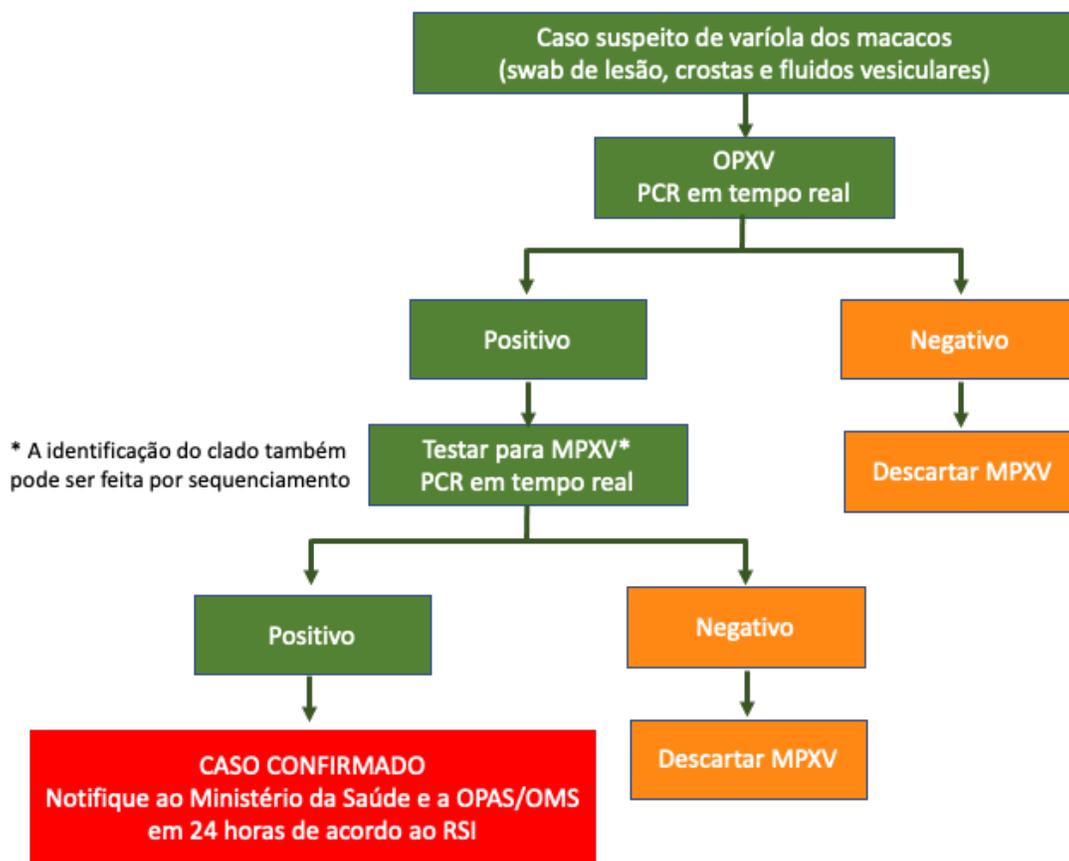
O protocolo sugerido (Li et al., *Journal of Virological Methods*. 2010. 169, 223–7) foi publicado e está disponível no seguinte link: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012> O protocolo detalhado está anexado ao final deste documento (Anexo 1).

Este protocolo se baseia na detecção inicial do MXPV através de uma PCR genérica em tempo real. Se positivo, é seguido por uma reação posterior direcionada a 2 alvos adicionais, uma para o clado de MPXV da África Ocidental e outra para o clado da Bacia do Congo.

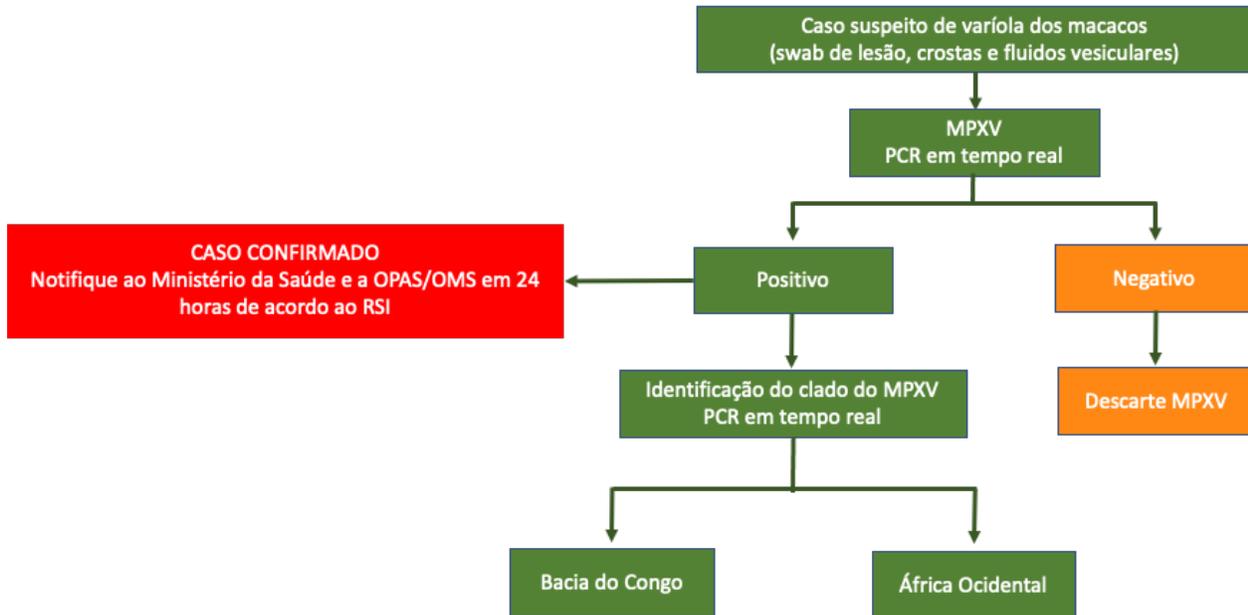
A OPAS/OMS distribuirá reagentes específicos (primers, sondas e controles positivos) e protocolos de trabalho para ensaios OPX e MPXV em toda a Região.

Os possíveis algoritmos de diagnóstico para PCR inicial de OPXV ou para PCR específica de MPXV são apresentados abaixo.

Detecção molecular, Algoritmo 1



Detecção molecular, Algoritmo 2



Interpretação dos resultados e relatório de dados

A confirmação da infecção por MPXV deve considerar as informações clínicas e epidemiológicas.

A detecção positiva por ensaio de PCR OPXV, seguida da confirmação de MPXV por PCR e/ou sequenciamento, ou detecção positiva por ensaio de PCR MPXV em casos suspeitos em áreas endêmicas e não endêmicas indica a confirmação da infecção por MPXV.

Embora seja preferível realizar testes confirmatórios específicos para MPXV, a detecção positiva por ensaio de PCR OPXV é considerada suficiente para a confirmação laboratorial de casos suspeitos em países não endêmicos.

Os dados de sequenciamento genômico também podem fornecer informações valiosas para ajudar a entender as origens, a epidemiologia e as características do vírus, por exemplo, se os casos surgem de uma única introdução ou de várias introduções de outros locais. Os países e laboratórios são incentivados a compartilhar suas sequências, incluindo dados brutos, sempre que possível, em tempo hábil, por meio de bancos de dados de acesso público disponíveis.

De acordo com o Regulamento Sanitário Internacional (RSI), todos os casos confirmados de varíola do macaco devem ser notificados dentro de 24 horas, através dos canais oficiais do RSI.

Diagnóstico diferencial

É importante considerar outras causas potenciais de lesões cutâneas discretas ou erupção cutânea generalizada e outras etiologias para lesões cutâneas de aparência similar nos diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo o vírus do herpes simples, vírus da varicela zoster, vírus do molusco contagioso, enterovírus, sarampo, sarna, Zika, Chikungunya, dengue, *Treponema pallidum* (sífilis), infecções bacterianas da pele, alergias a medicamentos, parapoxvírus, cancro mole, entre outros.

Amostras, material de coleta e temperatura de armazenamento para detecção do MPXV e diagnóstico diferencial

Tipo de amostra	Materiais de coleta*	Temperatura de armazenamento	Finalidade da coleta
Material da lesão cutânea, incluindo: <ul style="list-style-type: none"> • Esfregaço do exsudato da lesão • Borda superior das lesões (tetos) • Crostas de lesões 	Swabs de dácron ou poliéster com VTM ou cotonete seco	Refrigerar (2-8°C) ou congelar (-20°C ou menos) dentro de uma hora após a coleta; -20°C ou menos após 7 dias	Recomendado para o diagnóstico
Swab orofaríngeo	Swabs de dácron ou poliéster com VTM ou cotonete seco	Refrigerar (2-8°C) ou congelar (-20°C ou menos) dentro de uma hora após a coleta; -20°C ou menos após 7 dias	Recomendado para o diagnóstico, se viável, além do material da lesão cutânea
Soro	Tubos separadores de soro	Refrigerar (2-8°C) ou congelar (-20°C ou menos) dentro de uma hora após a coleta; -20°C ou menos após 7 dias	A ser considerado para sorologia ou para Apoiar o diagnóstico ou a investigação (segundo as diretrizes éticas)
Plasma	tubo de coleta com EDTA	Refrigerar (2-8°C) ou congelar (-20°C ou menos) dentro de uma hora após a coleta; -20°C ou menos após 7 dias	A ser considerado para sorologia ou para Apoiar o diagnóstico ou a investigação (segundo as diretrizes éticas)

*Além dos materiais de coleta específicos indicados, outros materiais e equipamentos necessários incluem: recipientes de transporte e sacos para coleta de amostras e embalagem tripla, refrigeradores e bolsas frias ou gelo seco, equipamentos de coleta de sangue estéreis (por exemplo, agulhas, seringas e tubos), etiquetas e marcadores permanentes, EPIs e materiais para a descontaminação de superfícies.

Referências

Organización Pan-Americana da Saúde. Alerta Epidemiológico Varíola do macaco em países não endêmicos - 20 de maio de 2022. Washington, DC: OPAS;2022. Disponível em: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-viruela-simica-paises-no-endemicos-20-mayo-2022>

Organización Mundial da Saúde. Testes laboratoriais para o vírus da varíola do macaco. Genebra: OMS, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MPX-laboratory-2022.1>

Organización Mundial da Saúde. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021-2022. [Orientação sobre regulamentações para transporte de substâncias infecciosas 2021-2022] Genebra: OMS, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240019720>

Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon IK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. J Virol Methods. 2010 Oct;169(1):223-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.012. Disponível em: [doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012)

Organización Pan-Americana da Saúde. Manual de manutenção para equipamentos de laboratório. Disponível em: <https://www.paho.org/es/documentos/manual-mantenimiento-para-guias-laboratorio>

World Health Organization. Laboratory biosafety manual, 4th edition. Geneva: WHO; 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>

Organización Mundial da Saúde. Regulamento Sanitário Internacional (2005), terceira edição. Genebra: OMS; 2016. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241580496>

Anexo 1

Vírus da varíola do macaco (MPVX, sigla em inglês para *monkeypox virus*) Protocolo de PCR em tempo real

Ensaios para detecção genérica de MPXV (espécie: *virus Monkeypox*, gênero: *Orthopoxvirus*) e seus dois clados:¹

- Ensaio com primers e sonda G2R_G: detecta todas as cepas de MPXV
- Ensaio com primers e sonda G2R_WA: detecta as cepas do clado da África Ocidental
- Ensaio com primers e sonda C3L: detecta cepas do Clado da Bacia do Congo
- As sequências dos primers e sondas estão no final do documento.
- Todas as sondas são do tipo sonda de hidrólise ("TaqMan") ligada ao fluoróforo FAM e *quencher* BHQ-1.

1. Mistura

As misturas para cada um dos ensaios (G2R_G, G2R_WA ou C3L) são preparadas separadamente.

Componente	Volume por reação	Volume por reação
	EXPRESS qPCR Supermix Universal ²	TaqMan® Universal PCR Master Mix ³
água (livre de RNase/DNase) ⁴	3.0 µl	3.0 µl
tampão de reação (2x) ⁴	10.0 µl	10.0 µl
primer <i>forward</i> (10 µM)	0.8 µl	0.8 µl
primer <i>reverse</i> (10 µM)	0.8 µl	0.8 µl
sonda (10 µM)	0.4 µl	0.4 µl
Total por reação	15 µl	

2. DNA

Adicionar **5 µl** de DNA ou controle em 15 µl de mistura (volume total de reação: 20 µl).

Incluir **controles** positivos e negativos para avaliar a validade da corrida.

¹ Li *et al.*, *Journal of Virological Methods* **169**, 223–7 (2010).

² Invitrogen, números de catálogo: 11785-200, 11785-01K, 11795-200 ou 11795-01K.

³ Applied Biosystems, números de catálogo: 4304437, 4364338, 4364340, 4305719, 4318157 ou 4326708.

⁴ Os volumes são para uso com os kits indicados e devem ser ajustados ao usar outros kits.

Isenção de responsabilidade: A menção de empresas específicas ou de produtos de determinados fabricantes não implica que sejam aprovados ou recomendados pela Organização Pan-Americana da Saúde em detrimento de outros de natureza similar que não forem mencionados.

3. Ciclagem⁵

Ensaio G2R_G ou ensaio C3L	
EXPRESS qPCR Supermix Universal	TaqMan® Universal PCR Master Mix
2 passos de:	2 passos de:
50°C por 2 minutos (incubação UNG)	50°C por 2 minutos (incubação UNG)
95°C por 6 minutos (ativação da polimerase)	95°C por 10 minutos (ativação da polimerase)
45 ciclos de PCR:	45 ciclos de PCR de:
95°C por 15 segundos	95°C por 15 segundos
60°C por 30 segundos (leitura da fluorescência neste passo)	60°C por 30 segundos (leitura da fluorescência neste passo)

Ensaio G2_WA	
EXPRESS qPCR Supermix Universal	TaqMan® Universal PCR Master Mix
2 passos de:	2 passos de:
50°C por 2 minutos (incubação UNG)	50°C por 2 minutos (incubação UNG)
95°C por 6 minutos (ativação da polimerase)	95°C por 10 minutos (ativação da polimerase)
45 ciclos de PCR:	45 ciclos de PCR de:
95°C por 15 segundos	95°C por 15 segundos
62°C por 30 segundos (leitura da fluorescência neste passo)	62°C por 30 segundos (leitura da fluorescência neste passo)

⁵ Os tempos de incubação UNG e ativação da polimerase são para uso com os kits indicados e devem ser ajustados ao usar outros kits.

4. Sequências dos primers e sondas

Ensaio G2R_G (detecção genérica do MPXV)	
primer G2R_G <i>forward</i>	5'-GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG
primer G2R_G <i>reverse</i>	5'-GCTATCACATAATCTGGAAGCGTA
sonda G2R_G	5'FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-3'BHQ1

Ensaio G2_WA (detecção das cepas do clado da África Ocidental)	
primer G2R_WA <i>forward</i>	5'-CACACCGTCTCTCCACAGA
primer G2R_WA <i>reverse</i>	5'-GATACAGGTTAATTTCCACATCG
sonda G2R_WA	5'FAM-AACCCGTCGTAACCAGCAATACATTT-3'BHQ1

Ensaio C3L (detecção das cepas do clado da Bacia do Congo)	
primer C3L <i>forward</i>	5'-TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA
primer C3L <i>reverse</i>	5'-GGCATCTCCGTTTAATACATTGAT
sonda C3L	5'FAM-CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA-3'BHQ1