



## **Estratégias laboratoriais para identificação da infecção pelo novo coronavírus**

Em meio ao avanço da pandemia do coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), a COVID-19, não surpreende que o diagnóstico laboratorial da doença seja foco de grande interesse. Uma avalanche de informações tem sido veiculada sobre quem e quando testar, as amostras biológicas adequadas e os testes laboratoriais disponíveis. O número crescente de casos impõe desafios ao sistema de saúde, sendo um dos pontos críticos a disponibilização de testes diagnósticos rápidos e acurados que possam ser usados no diagnóstico e acompanhamento dos casos e no rastreamento da população de risco.

Neste momento em que tudo é muito novo, é preciso cautela para evitar ansiedade por parte da população e dos profissionais de saúde, sob risco de utilizar estratégias de testagem inadequadas, que não contribuirão para o diagnóstico dos casos, o mapeamento epidemiológico, além de onerarem desnecessariamente o sistema de saúde neste cenário já tão crítico.

A seguir, são apresentadas e discutidas pelos patologistas clínicos professores desta Faculdade, as questões consideradas mais relevantes sobre o diagnóstico laboratorial da infecção pelo SARS-CoV-2, com base no que se sabe até o momento sobre o assunto, sempre tendo em vista o uso racional de exames laboratoriais e as boas práticas de laboratório clínico.

### **1. O que é a COVID-19?**

*Coronavirus disease 2019* (COVID-19) é uma infecção respiratória causada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), descrita inicialmente na China em dezembro de 2019, assumindo posteriormente proporções de pandemia.

### **2. Quem deve ser testado?**

De acordo com o Protocolo de Infecção Humana pelo SARS-COV-2 do Centro de Operações de Emergência em Saúde – COES MINAS COVID-19 da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (SES-MG), Nº 02/2020 – 23/03/2020, no momento atual, têm indicação de coleta de amostra e testagem para a COVID-19 as situações mostradas na Figura 1.

É muito importante lembrar que, durante a pandemia, tudo é muito dinâmico e as orientações podem mudar rapidamente, de acordo com novas recomendações da



Organização Mundial da Saúde (OMS), do Ministério da Saúde e de órgãos reguladores estaduais.

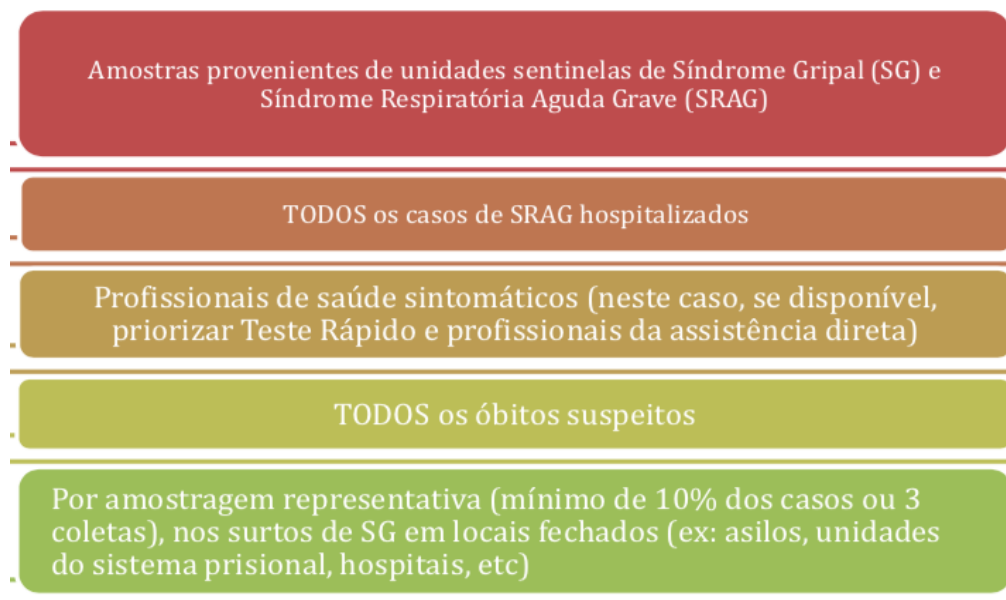
Segundo o Guia de Vigilância em Saúde (2019), disponível em [https://bvsmg.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_3ed.pdf](https://bvsmg.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf), tem-se como definições:

**SÍNDROME GRIPAL:** indivíduo com febre, mesmo que referida, acompanhada de tosse ou dor de garganta e com início dos sintomas nos últimos 7 dias.

**SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE:** indivíduo de qualquer idade, internado com SG e que apresente dispneia ou saturação de O<sub>2</sub> < 95% ou desconforto respiratório.

De acordo com a classificação de manejo clínico dos casos de coronavírus no Protocolo Estadual (disponível em [www.saude.mg.gov.br/coronavirus](http://www.saude.mg.gov.br/coronavirus)), os casos LEVES serão classificados como Síndrome Gripal e os casos GRAVES e INTERNADOS serão classificados como Síndrome Respiratória Aguda Grave.

**Figura 1:** Situações com indicação para coleta de amostra e testagem para COVID-19 no momento atual





### 3. Qual é a dinâmica da carga viral e da resposta imunológica ao SARS-CoV-2?

A carga viral, em média, pode ser detectada por metodologias moleculares entre 0 a 12 dias de sintomas. Casos de detecção prolongada, podendo chegar a mais de quatro semanas, têm sido observados, especialmente em situações de maior gravidade.

Os anticorpos podem ser detectados com melhor sensibilidade a partir de 7 a 10 dias de sintomas, dependendo do método.

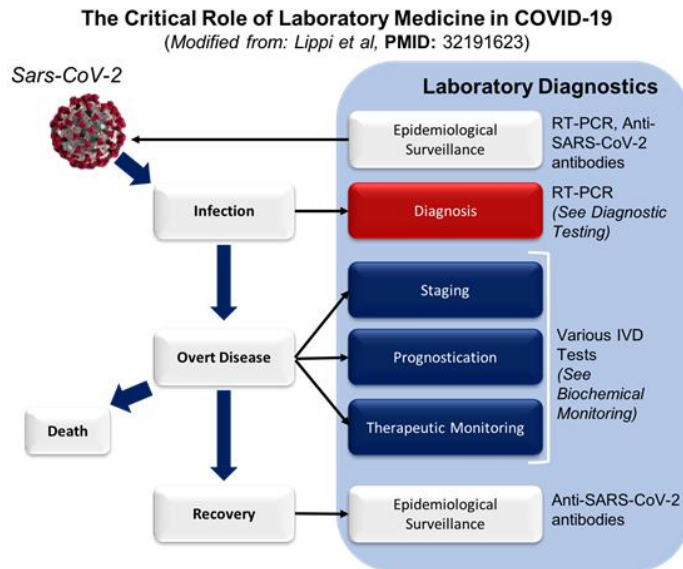
### 4. Quais são os métodos laboratoriais disponíveis para avaliação do paciente com suspeita de COVID-19?

Existem atualmente muitas opções comerciais para o diagnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2, em sua maioria ainda sendo cientificamente avaliadas. É importante distinguir esses testes quanto a sua metodologia e aplicabilidade em diferentes momentos da evolução da doença.

- Testes de amplificação de ácidos nucleicos para SARS-CoV-2.
- Testes sorológicos para pesquisa de anticorpos IgA, IgG e/ou IgM, por método ELISA ou imunocromatográfico.
- Teste rápido para pesquisa de antígeno em *swab* de nasofaringe ou orofaringe, por método imunocromatográfico.
- Painel de vírus respiratórios: São testes de imunofluorescência direta ou reação da polimerase em cadeia (PCR) multiplex que detectam na mesma amostra de material do trato respiratório antígenos ou material genético de várias bactérias e vírus, como adenovírus, coronavírus 229E, coronavírus HKU1, coronavírus NL63, coronavírus OC43, metapneumovírus humano, influenza A subtipo H1, H3 e H1-2009), influenza B, parainfluenza 1, 2, 3 e 4, rinovírus/enterovírus, vírus respiratório sincicial, *Bordetella pertussis*, *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae*.

Além da contribuição para o diagnóstico da COVID-19, os exames laboratoriais são essenciais no monitoramento dos casos, bem como no mapeamento epidemiológico (Figura 2).

**Figura 2:** Papel crítico da medicina laboratorial na COVID-19



\*Retirado de <https://www.ifcc.org/ifcc-news/2020-03-26-ifcc-information-guide-on-covid-19/>  
IVD – *In-vitro diagnostic*

## 5. Qual é o teste recomendado para o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2?

O teste recomendado para o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 é a reação da polimerase em cadeia com transcrição reversa em tempo real (rRT-PCR) em amostras clínicas do trato respiratório superior ou inferior. A maior parte dos testes de rRT-PCR disponíveis é baseada nos protocolos do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta e do Hospital Universitário Charité, Berlin.

## 6. Quando fazer o teste rRT-PCR para o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2?

Apesar de o período ótimo para a coleta de amostras do trato respiratório após o desenvolvimento dos sintomas ainda não estar definido, ela deve ser realizada o mais precocemente possível a partir do momento da identificação do paciente como caso suspeito ou provável de COVID-19.



## 7. Quais são as amostras biológicas aceitáveis para rRT-PCR e como coletá-las e armazená-las?

- Tipo de amostras:
  - Trato respiratório superior: *Swab* de nasofaringe e/ou orofaringe (não utilizar *swabs* de alginato de cálcio ou algodão, que podem inativar alguns vírus e inibir a reação de PCR) ou aspirado/lavado nasofaríngeo.
  - Trato respiratório inferior: Lavado broncoalveolar (LBA), aspirado traqueal (AT) ou escarro.
- Orientações de Coleta:
  - *Swabs*: pedir ao paciente para assoar o nariz em um lenço descartável de modo a eliminar o excesso de pus e muco e desprezar em lixeira própria para resíduo infectante.
  - *Swab* de Nasofaringe: Inserir o *swab* em uma das narinas, paralelamente ao palato. Deixar o *swab* no local por alguns instantes para absorver as secreções. Repetir o procedimento na outra narina.
  - *Swab* de Orofaringe: Coletar material da orofaringe posterior, evitando a base da língua, os dentes e as bochechas.
  - Aspirado/lavado nasofaríngeo, LBA e AT: seguir as instruções de coleta da instituição. Coletar 2 a 3 mL em um frasco estéril, estanque e com tampa de rosca.
  - Escarro: O paciente deve enxaguar a boca com água, forçar uma tosse profunda com expectoração diretamente dentro do recipiente estéril de boca larga e tampa de rosca, próprio para coleta de escarro.
- Precauções: A coleta deve ser realizada por profissional capacitado e devidamente paramentado. Devem ser utilizados para a coleta avental descartável, luvas, máscara N95 ou PFF2 ou EPR semifacial com filtro P2 e óculos de proteção. Acompanhantes não devem permanecer na sala no momento da coleta.
- Conservação: Inserir os *swabs* imediatamente (se necessário, cortar o excesso dos cabos) após a coleta em 2-3 mL de solução fisiológica a 0,9% estéril ou meio de transporte universal viral (UTM®). Todas as amostras devem ser mantidas refrigeradas (4-8°C) e devem ser processadas até 72 horas da coleta. Após esse período, devem ser congeladas a -70°C.



### 8. Qual amostra deve ser coletada, prioritariamente, para a rRT-PCR?

- *Swab* de nasofaringe, isoladamente ou em combinaçãõ com *swab* de orofaringe, é a amostra de preferência.
- *Swab* de orofaringe isolado é aceitável apenas quando não for possível coletar outros tipos de amostras.
- Recomenda-se a coleta de escarro de todo paciente com tosse produtiva, mas nunca escarro induzido.
- Lavado broncoalveolar ou aspirado traqueal deve ser coletado de pacientes com quadro respiratório grave, por exemplo, naqueles em ventilação mecânica.

### 9. Como solicitar o exame rRT-PCR para diagnóstico da COVID-19?

- Material: *swab* de naso e/ou orofaringe, aspirado/lavado nasofaríngeo, lavado brocoalveolar, aspirado traqueal ou escarro.
- Exame: rRT-PCR para SARS-CoV-2.

### 10. Quais são as orientações aos laboratórios sobre amostras para rRT-PCR?

De acordo com o Protocolo de Infecção Humana pelo SARS-CoV-2 do COES MINAS COVID-19 da SES-MG, N° 02/2020 – 23/03/2020, as amostras devem ser encaminhadas para a FUNED ou aos laboratórios habilitados pela entidade, conforme orientações disponíveis em [funed.mg.gov.br/fichasformularios-manuais-e-termos-de-coleta-de-amostras](http://funed.mg.gov.br/fichasformularios-manuais-e-termos-de-coleta-de-amostras).

### 11. Quais são as limitações da rRT-PCR?

Os valores preditivos positivo e negativo de um teste são altamente dependentes da prevalência da doença. Resultados falsos-positivos podem ocorrer quando a prevalência da doença é baixa e falsos-negativos quando a prevalência da doença é alta. Portanto, o resultado da rRT-PCR deve ser correlacionado aos dados clínicos e epidemiológicos do paciente.

Resultados falso-positivos podem ocorrer por contaminação da amostra, não observação às recomendações para a execução do exame ou má-qualidade dos reagentes.

Vários fatores podem levar a um resultado negativo em um indivíduo infectado, sejam pré-analíticos ou analíticos, incluindo:

- Má qualidade da amostra, contendo pouco material do paciente;
- Amostra coletada tardiamente ou muito precocemente no início da infecção;
- Amostra não transportada ou conservada adequadamente;



- Razões técnicas inerentes ao teste, como mutação viral ou presença de inibidores de PCR.
- Presença de pequeno número de microrganismos na amostra, abaixo do limite de detecção do teste.

Até o momento, não há dados consistentes na literatura sobre o desempenho da rRT-PCR para a COVID-19. De forma geral, o teste não detecta outros coronavírus, ou outras espécies de vírus e bactérias, assim a especificidade e o valor preditivo positivo seriam de 100%. No entanto, os fabricantes avaliam a especificidade com pequeno número de microrganismos e em condições ótimas. Na rotina de testagem de um grande número de amostras, pode ser que alguns resultados falso-positivos ocorram, apesar de não haver ainda relatos na literatura.

A questão da sensibilidade é ainda mais complicada, pois há grande variabilidade de acordo com o tipo de amostra analisada, bem como em relação à oscilação da carga viral. Como exemplo, há alguns relatos de até 20% de falso-negativo para rRT-PCR, mas utilizando *swab* de orofaringe, que tem baixa sensibilidade.

## **12. Qual a conduta diante de um resultado não detectado de SARS-CoV-2 por rRT-PCR e suspeita de COVID-19?**

Um único resultado não detectado, principalmente se for de amostra do trato respiratório superior, não exclui infecção por COVID-19.

Como mencionado acima, a sensibilidade de diferentes amostras biológicas para detecção de SARS-CoV-2 varia. Um estudo recentemente publicado avaliou 1070 amostras de 205 pacientes com COVID-19 e observou os seguintes valores de sensibilidade: BAL 93%, escarro 72%, *swab* nasal 63%, *swab* de orofaringe 32%, fezes 29%, sangue 1% e urina 0%.

Recomenda-se a coleta de nova amostra, preferencialmente do trato respiratório inferior, em caso de doença grave ou progressiva, ou na presença de dados clínico-epidemiológicos fortemente sugestivos de COVID-19, quando a primeira amostra é negativa.

## **13. Quando e por que repetir a rRT-PCR?**

Sempre que houver discordância com o quadro clínico-epidemiológico, a rRT-PCR deve ser repetida em outra amostra do trato respiratório, seja o resultado positivo (detectado) ou negativo (não-detectado).

Como o intervalo de tempo para o pico dos níveis virais na COVID-19 ainda é desconhecido, o tempo ótimo para a coleta das amostras biológicas para o diagnóstico da infecção não foi estabelecido. Um estudo chinês descreveu que 3,0% de 167



pacientes com evidência tomográfica (TC tórax) de COVID-19 inicialmente apresentaram rRT-PCR negativa. Posteriormente, o swab de todos os pacientes converteu a positivo, em um intervalo médio de  $5,0 \pm 2,7$  dias.

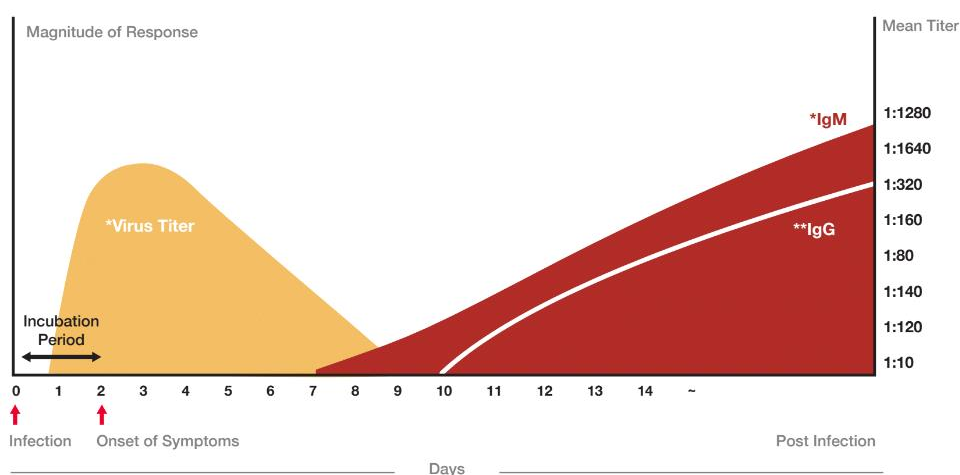
Assim, eventualmente a coleta de múltiplas amostras, de locais e tempos diferentes durante a evolução do paciente, pode ser necessária para o diagnóstico da infecção.

Por fim, resultado não detectado para SARS-CoV-2 pode representar verdadeiro negativo e/ou infecção por outros vírus ou bactérias respiratórias. Em um estudo com 210 pacientes com suspeita de COVID-19, 30 testaram positivo para outro patógeno e 11 para SARS-CoV-2. Ademais, coinfeção com SARS-CoV-2 e outros vírus respiratórios, como Influenza, também pode ocorrer. O Ministério da Saúde recomenda testar todas as amostras de pacientes com suspeita de COVID-19 com o Painel de Vírus Respiratórios.

#### 14. Qual é o papel dos testes imunológicos na COVID-19?

Os testes imunológicos chegam ao mercado como alternativa para suprir a demanda de exames para o diagnóstico, acompanhamento e mapeamento epidemiológico da COVID-19, gerando grande expectativa, não supreendentemente. Entretanto, é importante considerar as limitações destes exames, em especial no que se refere à dinâmica da resposta imunológica ao SARS-CoV-2, embora a literatura seja ainda muito limitada no assunto (Figura 3).

**Figura 3:** Dinâmica do título viral e da resposta imunológica ao SARS-CoV-2



The timing and level of antibodies is uncertain after SARS-COV-2 infection, and varies between patient populations. This graphic depicts one scenario based on the limited published evidence.





## Testes de detecção baseados em antígenos

Durante os primeiros dias de infecção (aproximadamente 1 a 5), são geradas proteínas virais que podem ser detectadas por diferentes testes (ELISA e imunofluorescência, por exemplo). Em geral, esse tipo de teste tem especificidade aceitável (variando de acordo com o teste). Portanto, sua detecção pode ser usada como critério de confirmação, conjuntamente com a definição do caso, a história clínica e a história epidemiológica e para orientar decisões em saúde pública (por exemplo, sobre o isolamento).

No entanto, a dinâmica de produção e secreção dessas proteínas (antígenos) ainda não foi estabelecida. Um resultado negativo (em qualquer fase da infecção) não deve ser utilizado como critério para excluir um caso, e outros critérios devem ser considerados.

## Testes de detecção sorológica

### Descrição:

Trata-se da detecção de anticorpos (anticorpos totais IgA/IgG ou IgM/IgG ou anticorpos isolados IgA/ IgG/ IgM) no sangue total, sangue capilar, soro ou plasma (testes rápidos ou *point of care*) ou soro/plasma (ELISA ou quimioluminescência) para avaliação da resposta imunológica ao SARS-CoV-2. Os testes para detecção de anticorpos específicos variam bastante em relação à classe do anticorpo a ser detectado. Alguns detectam IgG e IgM simultaneamente, sem distinguir o isotipo. Outros são capazes de diferenciar a presença de IgG isolada, IgM ou ainda a presença de ambos. De acordo com os dados disponíveis até o momento, estes testes podem variar na sensibilidade de 88,6 a 93,3%, e na especificidade de 90,6 a 100%.

### Vantagens e limitações:

- ✓ Ensaios baseados na detecção de anticorpos IgM/IgG podem apoiar a investigação de surtos e estudos de soro-prevalência. Há diversas opções disponíveis, tanto testes rápidos, quanto ELISA.
- ✓ Atualmente, os testes sorológicos não são recomendados para o diagnóstico da COVID-19 pelo CDC, *National Health Service* (NHS) ou outras organizações de saúde.
- ✓ Um resultado negativo por teste sorológico não afasta a doença. Existe uma preocupação geral quanto ao uso na fase aguda da infecção, pois estes testes detectam a infecção muito tardiamente no curso da doença (geralmente mais de 7 a 10 dias). Alguns estudos demonstraram que nos primeiros 7 dias após o início dos sintomas, menos de 40% dos pacientes apresentam anticorpos detectáveis. Dessa maneira, estes ensaios não devem ser usados para descartar casos nos primeiros dias de doença.



- ✓ A detecção de anticorpos após o 7<sup>o</sup> dia indica apenas contato prévio com o vírus, mas não confirma a presença de vírus ou infectividade. Os anticorpos detectados podem resultar de uma infecção anterior, e não da infecção aguda que se necessita diagnosticar.
- ✓ Deve-se lembrar que a especificidade dos testes sorológicos pode ser comprometida pela reatividade cruzada com outros coronavírus (ainda não estabelecida) que normalmente estão presentes na população, dificultando a interpretação dos resultados.
- ✓ Até o momento, não há estudos que avaliaram a resposta sorológica de pacientes assintomáticos com COVID-19 ou indicando que a presença de anticorpos IgG significa imunidade contra o SARS-CoV-2.
- ✓ Não existem também, até a presente data, dados consistentes de validação dos testes sorológicos na população brasileira. Mais estudos são necessários para o completo entendimento do papel destes testes na infecção pelo SARS-CoV-2.
- ✓ No entanto, no futuro espera-se o uso de testes sorológicos aprimorados para monitoramento e avaliação da saúde pública e ocupacional.

A ANVISA vem liberando, nos últimos dias, o registro de testes rápidos (imunocromatográficos) sorológicos para a detecção de anticorpos IgG e IgM anti-SARS-CoV-2, semelhantes àqueles atualmente usados para anticorpos anti HIV, anti-*T. pallidum* e anti HBs. Há também o registro de testes para detecção de antígenos virais, que usam amostras de nasofaringe e orofaringe.

Ressalta-se que as boas práticas de laboratório clínico orientam que o laboratório deve ter procedimento documentado descrevendo o processo de validação de novas metodologias e tecnologias e os registros dos resultados obtidos, assim como a análise crítica. Portanto, as informações dos fabricantes quanto ao desempenho analítico de um teste devem ser validadas pelo estabelecimento que se propõe a utilizá-lo, antes de ofertá-lo à sociedade.



## Referências bibliográficas

1. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. 19 March 2020.  
<https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
2. World Health Organization. *Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance, 21 March 2020.*  
[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID-19-lab\\_testing-2020.1-eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID-19-lab_testing-2020.1-eng.pdf)
3. GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS, SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE, CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIA EM SAÚDE – COES MINAS COVID-19. Atualização Técnica ao Protocolo de Infecção Humana pelo SARS-COV-2 N° 01/2020 – 20/03/2020 - Definições de casos operacionais e fluxos de testagem laboratorial e notificação dos casos.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).
5. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med.* 2020 Mar 16. pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0285/cclm-2020-0285.xml. doi: 10.1515/cclm-2020-0285.
6. Wang W, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA.* 2020 Mar 11. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
7. Xie X, Z *et al.* Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology.* 2020 Feb 12:200343. doi: 10.1148/radiol.2020200343.
8. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel, Instructions for Use. 15/03/2020.
9. Bajema KL, *et al.* 2019-nCoV Persons Under Investigation Team, 2019-CoV Persons Under Investigation Team. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(6):166.
10. Loeffelholz MJ & Tang Y. (2020) Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art. *Emerging Microbes & Infections.* 9:1, 747-756, DOI: 10.1080/22221751.2020.1745095
11. Métodos Laboratoriais para Diagnóstico da Infecção pelo SARS-CoV-2 - Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). <http://www.sbpc.org.br/noticias-e-comunicacao/sbpcml-alerta-sobre-utilizacao-correta-dos-testes-rapidos/>
12. Guo L *et al.* Profiling Early Humoral Response to diagnose novel Coronavirus Disease (COVID-19) *Clin Infect Dis.* 2020, Mar 21
13. Li Z *et al.* Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J Med Virol.* 2020 Feb 27.
14. <https://www.ifcc.org/ifcc-news/2020-03-26-ifcc-information-guide-on-covid-19/>
15. <https://www.paho.org/en/documents/laboratory-guidelines-detection-and-diagnosis-covid-19-virus-infection>
16. Fei Zhou *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020; 395: 1054–62



17. Wölfel, R., Corman, V.M., Guggemos, W. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
18. Documento do Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA), de 01/04/2020 - RCPA advises against COVID-19 IgG/IgM rapid tests for the detection of early COVID disease.

Autores:

Fabiano de Almeida Brito

Letícia Maria Henriques Resende

Luciana de Gouvêa Viana

Sandra Guerra Xavier

Suzane Pretti Figueiredo Neves

Belo Horizonte, 07 de abril de 2020