

SARS-CoV-2: Diagnóstico Laboratorial

SARS-CoV-2: Laboratory Diagnosis

Magalhães, S.¹

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

RESUMO

A COVID-19 foi declarada, pela Organização Mundial de Saúde, como pandemia no dia 11 de março de 2020. Foram aplicadas medidas de quarentena e isolamento, na tentativa de limitar a disseminação do vírus, sendo que a identificação precoce dos casos e respetivo diagnóstico laboratorial assumiram uma importância fulcral.

Este artigo aborda os principais métodos na deteção de SARS-CoV-2 em amostras biológicas: testes de biologia molecular, testes de deteção de antigénio e testes serológicos.

Palavras-chave: SARS-Cov-2, Diagnóstico Laboratorial rRT-PCR, Serologia.

ABSTRACT

COVID-19 was declared by the World Health Organization as a pandemic on March 11, 2020. Quarantine and isolation measures were applied in an attempt to limit the spread of the virus, with the early identification of cases and the respective diagnosis laboratory tests assumed a central importance.

This article discusses the main methods for the detection of SARS-CoV-2 in biological samples: molecular biology tests, antigen detection tests and serological tests.

Keywords: SARS-Cov-2, Laboratory Diagnosis rRT-PCR, Serology.

¹ Departamento de Microbiologia, Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Agostinho Ribeiro, 4610- 106 Felgueiras, Portugal.

Autora para correspondência: Sónia Magalhães; analises.har@gmail.com; Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Agostinho Ribeiro, 4610-106 Felgueiras.

Submetido/Submitted: 12 junho 2020 | Aceite/Accepted: 12 junho 2020

INTRODUÇÃO

SARS-CoV-2 (novo Coronavírus), é o agente etiológico da doença Covid-19, que teve início no final de 2019 em Wuhan, na China, e se propagou por todo o mundo, tendo sido declarada como pandemia no dia 11 de março de 2020¹.

Os Coronavírus são vírus RNA, causadores de infeções respiratórias, gastrointestinais, hepáticas e neurológicas em animais. Todos os coronavírus partilham semelhanças em termos de organização e expressão do seu genoma, que codifica 16 proteínas não estruturais e 4 proteínas estruturais: glicoproteína “spike” de superfície (S), glicoproteína de envelope (E), proteína de membrana (M), e proteína de nucleocapsídeo (N). Os vírus desta família são de origem zoonótica. Sete coronavírus são conhecidos como patógenos humanos. Destes, três causam infeções respiratórias por vezes graves nos humanos e responsáveis por grandes surtos de pneumonia no século XXI: SARS-CoV-2, MERS-CoV e SARS-CoV².

Os sintomas mais frequentes associados à infeção pela COVID-19 são: febre, tosse e dificuldade respiratória. Eventualmente pode surgir dor de garganta, corrimento nasal, dores de cabeça e/ou musculares e cansaço. Os casos mais graves são caracterizados por pneumonia grave com insuficiência respiratória aguda, falência renal e de outros órgãos, e eventual morte. Estes ocorrem predominantemente em adultos com idade avançada ou comorbilidades médicas subjacentes como hipertensão, diabetes mellitus e doença cardiovascular³.

O SARS-CoV-2 é transmitido de pessoa para pessoa principalmente por gotículas respiratórias, mas também é equa-

cionada a transmissão indireta através das superfícies contaminadas.

Atualmente, estima-se que o período de incubação da doença (tempo decorrido desde a exposição ao vírus até ao aparecimento de sintomas) seja entre 2 e 14 dias, com a maioria dos casos a mostrar sintomas aproximadamente 4 a 5 dias após a exposição.

Medidas de quarentena e isolamento foram aplicadas, na tentativa de limitar a disseminação do vírus, sendo que a identificação precoce dos casos e respetivo diagnóstico laboratorial são de importância fulcral⁴.

CLASSIFICAÇÃO

Os testes Laboratoriais para deteção de SARS-CoV-2 podem ser classificados como:

- Testes de biologia molecular: rRT-PCR, que detetam RNA viral;
- Testes de antigénio que detetam proteínas, tais como proteínas da superfície do vírus;
- Testes serológicos que detetam anticorpos (IgA, IgG, IgM) produzidos como resposta do organismo à infeção pelo vírus.

Estes testes apresentam indicações e utilizações clínicas diferentes, sendo que o diagnóstico de novos casos de infeção por SARS-Cov-2 deve ser realizado por biologia molecular (rRT-PCR). Os resultados de todos os testes são, no entanto, importantes, na implementação de medidas de contenção e decisões relativas à saúde pública⁵.

Testes de Biologia Molecular

O teste mais usado para o diagnóstico de Covid-19 tem sido o RT PCR em tempo real, que se trata de uma trans-

crição reversa (utilizando uma enzima, a transcriptase reversa para transformar RNA do vírus em DNA complementar), seguida de reação em cadeia da polimerase.

O primeiro passo, como em todas as determinações laboratoriais, será a colheita de produtos biológicos. Esta deve ser efetuada por profissionais devidamente habilitados para a realização da colheita, conservação e seu acondicionamento. Os profissionais de saúde devem cumprir as regras de prevenção e controlo de infeção aplicáveis, assim como a correta utilização de EPI⁶.

Para o diagnóstico laboratorial de Sars-CoV-2, está indicada a colheita de produtos biológicos do trato respiratório superior e/ou inferior, de acordo com o contexto clínico.

A amostra colhida com mais frequência é o exsudado da nasofaringe e orofaringe, colhidos em zaragatoas e colocadas num mesmo meio de transporte para vírus⁷. O CDC ressalva, que apenas se devem usar zaragatoas de fibra sintética com haste de plástico, como as zaragatoas de dracon ou floculadas. Não devem ser usadas zaragatoas de alginato de cálcio ou zaragatoas com haste de madeira, pois podem conter substâncias que inativam alguns vírus⁸.

Após a desinfeção exterior dos tubos e recipientes no local da colheita, as amostras são enviadas em ambiente refrigerado ao laboratório, utilizando um sistema de embalagem tripla⁹.

Chegados ao laboratório, o tratamento destes produtos biológicos e inativação do RNA viral deve ser realizado em câmara de fluxo laminar Classe II, segundo norma da DGS7.

A extração do RNA viral pode ser rea-

lizada de forma automatizada ou manual, existindo para o efeito vários kits comerciais disponíveis. Trata-se de um processo que visa separar o RNA de todos os outros elementos da amostra: células, proteínas, enzimas, etc. Segue-se então, a amplificação dos ácidos nucleicos, com a reação em cadeia da polimerase em tempo real, precedida de transcrição reversa. Neste processo, e descrito de uma forma simplista, são utilizados “primers”, que foram projetados para encontrar e se ligar a segmentos específicos do genoma viral, mediante ciclos coordenados de temperatura. Desta forma reconhecem e amplificam apenas material genético do vírus. É obtido um valor de Ct, que é o número de ciclos de replicação necessários para produzir um sinal fluorescente, com valores mais baixos de Ct representando maior carga de RNA viral.

Os testes de rRT-PCR para a deteção de SARS-CoV-2, podem incluir como alvo os genes que codificam para a nucleoproteína (N), o invólucro (E), a espícula (S) ou a RNA dependente RNA polimerase (RdRP)⁶.

Como em todas as outras áreas do diagnóstico laboratorial, devem ser sempre utilizados controlos internos, para assegurar a qualidade do produto biológico e do processo de diagnóstico laboratorial. Um resultado laboratorial dado como “Detetado” para a pesquisa RNA Coronavírus SARS-Cov-2, implica um resultado de rRT-PCR positivo pelo menos para dois alvos distintos de genoma, dos quais um específico para Sars-Cov-2, que o distinga dos outros Coronavírus, incluindo o Sars-Cov-1¹⁰.

A colheita correta das amostras e a fase da infeção são factores determinantes

para a deteção laboratorial. A excreção de RNA viral pode ser mais ou menos prolongada, dependendo da gravidade da doença e de factores relacionados com a pessoa infetada, como factores genéticos, idade, etc. O mesmo acontece com a carga viral. A probabilidade de um teste de biologia molecular, ser positivo parece decrescer com o número de dias após o início dos sintomas¹¹. Como qualquer outro meio de diagnóstico, os resultados dos testes laboratoriais devem ser sempre correlacionados com a história clínica e contexto epidemiológico, pelo que num doente com um quadro clínico fortemente suspeito um teste negativo por si só, não deve excluir a infeção por SARS-Cov-2.

Testes de deteção de antigénio

Os testes de deteção de antigénio têm uma sensibilidade menor do que os testes de biologia molecular, particularmente quando a carga viral é mais baixa. Assim, na fase inicial da infeção, a deteção da presença de uma proteína do Sars-Cov-2 pode ocorrer mais tarde do que a identificação do RNA viral por rRT-PCR¹².

Testes Serológicos

Os testes de deteção de anticorpos Sars-CoV-2 devem ser utilizados com precaução, uma vez que se desconhece a duração dos anticorpos desenvolvidos no decurso da infeção e não é possível inferir sobre a sua qualidade neutralizante e/ou capacidade de induzir imunidade. O perfil de seroconversão, depois da exposição ao vírus também ainda permanece em estudo. São testes de deteção de resposta imunológica e como

tal não estão recomendados para o diagnóstico de novos casos⁶.

Vários estudos indicam que a resposta imunológica nesta patologia é detetada a partir da segunda semana de infeção, ou seja, cerca de 8 a 10 dias após o aparecimento dos sintomas, apesar de já terem sido detetados anticorpos em alguns casos, mesmo no quinto dia após o início dos sintomas¹².

A seroconversão de IgM e IgG parece ocorrer entre a terceira e a quarta semana de início da doença clínica. Após isso, os títulos de IgM diminuem em comparação com os títulos de IgG, que podem persistir algum tempo (além das sete semanas) após a infeção por Sars-CoV-2, desconhecendo-se se esses anticorpos conferem imunidade de longa duração¹³.

Estes testes podem ser automatizados, sendo testes semi-quantitativos ou qualitativos de deteção de anticorpos (por exemplo Elisa ou Quimioluminescência) ou não automatizados (testes “rápidos”), que são testes qualitativos de deteção de anticorpos (por exemplo Imunocromatografia)¹⁴. Alguns destes testes já apresentam elevadas especificidade e sensibilidade e baixas reacções cruzadas.

Ambos os testes serológicos, utilizam como amostra, soro, sangue total ou plasma e podem detectar a presença de anticorpos IgA, IgM e IgG para Sars-Cov-2.

Em suma, os testes serológicos têm especial interesse na determinação da seroprevalência e na realização de estudos epidemiológicos. Podem contribuir para identificar indivíduos expostos ao vírus e avaliar a extensão da exposição de uma população e, assim, ajudar a decidir a

aplicação, execução ou levantamento de medidas de contenção¹⁵.

CONCLUSÃO

Dada a importância do diagnóstico laboratorial na resposta atempada à COVID-19 é imperativo sistematizar os testes disponíveis laboratorialmente para deteção de SARS-CoV-2, no sentido de clarificar a sua indicação e utilização clínicas. Os resultados destes testes laboratoriais devem ser sempre correlacionados com a história clínica e contexto epidemiológico. À data, o diagnóstico de novos casos de infeção por SARS-COV-2 deve ser realizado por testes de biologia Molecular, RT-PCR em tempo real, considerado de referência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. WHO Statement Regarding Cluster of Pneumonia Cases in Wuhan, China. Beijing: WHO. Disponível em <https://www.who.int/china/news/detail/09-01-2020-who-statement-regarding-cluster-of-pneumonia-cases-in-wuhan-china>
2. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus pathogenesis. *Adv Virus Res* 2011;81:85-164. doi: 10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2.
3. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585.
4. World Health Organization. Coronavírus. Disponível em <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>
5. World Health Organization (2020). Laboratory Testing for 2019 novel Coro-

navirus in suspected human cases: interim guidance - 19 March 2020. Geneva: WHO. Disponível em <https://www.who.int/publicationsdetail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>

6. Norma nº 007/2020 de 29/03/2020. Prevenção e Controlo de Infeção por SARS-CoV-2 (COVID-19): Equipamentos de Proteção Individual (EPI). Lisboa, 2020. Disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0072020-de-29032020-pdf.aspx>

7. Orientação nº 015/2020 de 23/03/2020 atualizada a 24/04/2020. COVID-19: Diagnóstico Laboratorial. Lisboa, 2020. Disponível em: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0152020-de-23032020-pdf.aspx>

8. European Center for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), CDC, 2020. Disponível em <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>

9. World Health Organization. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019-2020. Geneva: WHO; 2019. Disponível em <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325884/WHO-WHE-CPI-2019.20-eng.pdf?ua=1>

10. Comissão Europeia. Orientação sobre os testes de diagnóstico in vitro para a COVID-19 e o respetivo desempenho, *Jornal Oficial da União Europeia* C 122 de 15.04.2020. Disponível em <https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/tes->

ting_kits_communication_pt.pdf

11. Lou B, Li T, Zheng S, Su Y, Li Z, Liu W, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. medRxiv 2020; doi: 10.1101/2020.03.23.20041707.

12. Nandini, S, Sundararaj Stanleyraj J, Akihida R. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2 JAMA. Published online May 6, 2020. doi:10.1001/jama.2020.8259. Disponível em <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2765837>

13. To, KK, Owen, T, Wai-Shin, L, Tam, TW, Lung, D. 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. *The Lancet*, 20(5), 565-574, 2020. doi:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)

14. Circular Informativa Conjunta Nº 003/CD/100.20.200 de 27/05/2020. Testes Laboratoriais para SARS-CoV-2; Testes Rápidos. Lisboa, 2020. Disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/circular-informativa-conjunta-dgsinfarmedinsa-n-003cd10020200-de-27052020-pdf.aspx>

15. Long Q, Deng H, Chen J, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. medRxiv. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038018>.