

## **PRINCIPAIS TESTES DE IDENTIFICAÇÃO PARA SARS-COV2: UMA ABORDAGEM ANALÍTICA**

Bruno Vinicius da Silva Sousa, Maria Eduarda Junqueira Alves da Cunha, Thainá Rangel Vilela Rezende, Maicon Lemes de Oliveira, Rodolfo Ribeiro Júnior e Rafaela Ferreira França

### **Resumo**

O presente estudo faz uma análise dos testes mais utilizados no Brasil para diagnóstico de infecção pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), ressaltando as vantagens e desvantagens associadas ao uso de cada um deles. Foi feito um levantamento bibliográfico sobre os referidos testes, comparando-os e descrevendo suas vantagens e limitações em relação à realização da técnica, ponderações sobre a atuação do profissional e dados sobre a janela imunológica do paciente, que são importantes fatores a serem considerados na tomada de decisão de qual teste deverá ser utilizado. A doença causada pelo SARS-CoV-2 pode ser detectada através de métodos genéticos como detecção da sequência viral por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (qRT-PCR), e por métodos sorológicos, que pesquisam por anticorpos, entre eles a quimioluminescência e o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), e testes rápidos, como a imunocromatografia, para detecção de antígenos ou anticorpos.

Palavras-chave: detecção, SARS-CoV-2, qRT-PCR, métodos sorológicos, testes rápidos

### **Abstract**

The present study aimed to analyze the tests currently available in Brazil for the detection of the new coronavirus (SARS-CoV-2), highlighting advantages and drawbacks associated with the use of each one. A bibliographic survey was made on these tests, comparing them and describing their advantages and limitations concerning the technique, reflections about the professional performance and data regarding the patient's immunological window, which are important factors to consider in order to choose the best test to be used. The disease caused by SARS-CoV-2 can be detected using genetic methods such as based on viral sequence detection by polymerase chain reaction with reverse transcriptase (qRT-PCR) and by serological methods, which search for antibodies, including chemiluminescence and ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), and rapid tests, such as immunochromatography, used to detect antigens or antibodies.

Keywords: detection, SARS-CoV-2, qRT-PCR, serological methods, rapid tests

## 1. Introdução

O SARS-CoV-2 é um vírus da família Coronaviridae que se caracteriza por causar doenças no trato respiratório em animais e seres humanos. Suas partículas esféricas possuem 125 nm de diâmetro e projetam envelopes fosfolipídicos em forma de espículas que são formadas por trímeros da proteína S (spike protein), gerando um aspecto de coroa, por isso, o nome coronavírus (GRUBER, 2020). A interação da ligação da proteína S com o receptor de angiotensina 2 nas células humanas facilita sua infecção, fazendo com que o vírus consiga injetar seu material genético de RNA que será reconhecido pelos receptores de proteínas transmembranares (toll-like receptors) como um patógeno, levando à ativação do sistema imunológico (GUO; et al., 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a COVID-19 (coronavirus disease 2019) em 30 de janeiro de 2020, foi declarada como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional. Entretanto, somente no dia 11 de março de 2020, a COVID-19 foi caracterizada como uma pandemia. Sua identificação foi através do surto de doenças respiratórias primeiramente na cidade de Wuhan na China (Organização Pan-Americana de Saúde, 2020).

O diagnóstico desta patologia pode ser difícil, uma vez que uma gama de patógenos que podem causar síndrome respiratória aguda com quadro sintomático muito semelhante. Outro desafio diante dessa pandemia é constatar de maneira precisa a taxa de transmissão do SARS-CoV-2, o que é fundamental no estabelecimento de protocolos de prevenção e tratamento (RITCHIE, 2020). Para tanto, são utilizados testes com diferentes metodologias que visam auxiliar no diagnóstico desta patologia. As diferenças metodológicas implicam em recomendações específicas para cada tipo de teste, bem como demandam conhecimento técnico para correta realização e interpretação dos resultados.

Assim, o presente estudo visa apresentar os testes utilizados no diagnóstico do SARS-CoV-2, mostrando seus diferentes graus de sensibilidade, limites de detecção e, portanto, fornecendo dados para uma análise das aplicações e limitações dos exames, o que é fundamental para correta aplicação dos mesmos e monitoramento adequado do quadro da epidemia.

## 2. Metodologia

Foi realizado levantamento bibliográfico a respeito dos testes para detecção do SARS-CoV-2, suas aplicações e seus aspectos. Para a coleta de dados foi utilizado levantamento eletrônico de artigos

indexados na base de dados Scielo, Google Acadêmico, PubMed, Oxford, ANVISA. Foram utilizados, na busca dos artigos os seguintes descritores: COVID-19, PCR, exames, IgG, IgM, ELISA, Imunocromatografia, Quimioluminescência, método sorológico, detecção, exames complementares, amplificação, anticorpos.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. qRT-PCR**

A PCR (Polymerase Chain Reaction) é um teste de Reação em Cadeia da Polimerase que ocorre por etapas de variações de temperatura, multiplicando de forma exponencial a quantidade de DNA presente na amostra (DE CAMARGO; et al., 2020). Os ciclos prosseguem até que se obtenha material genético suficiente para ser identificado na amostra por meio de marcadores específicos, caso a amostra contenha o vírus em questão (MESA; et al., 2020). A versão usada para detecção do SARS-CoV-2 é a RT-PCR, quando o vírus possui RNA que será convertido em DNA complementar (GREEN; et al., 2020). No caso da RT-PCR em Tempo Real (ou qRT-PCR), que é uma variação da PCR convencional, a ampliação e detecção ocorrem simultaneamente, sem a utilização de espectrofotômetro.

Assim como as vacinas, o desenvolvimento de testes moleculares também depende do sequenciamento do genoma do vírus em questão, o que o torna a base para uma melhor compreensão do vírus que está sendo estudado. No Brasil, o genoma do SARS-CoV-2 foi sequenciado e disponibilizado no dia 28 de fevereiro de 2020 (Instituto Adolfo Lutz, 2020).

Dentre as centenas de tipos de testes desenvolvidos e usados no momento, o teste molecular RT-PCR em Tempo Real tem sido considerado como padrão ouro para detecção do SARS-CoV-2, devido à elevada sensibilidade demonstrada. Nesse método, busca-se pelo próprio material genético do vírus (ou antígeno), através de sua amplificação, e deve ser utilizado em pacientes sintomáticos ou para confirmação de diagnóstico (ANVISA, 2020).

Como o novo coronavírus possui uma longa fita de RNA de cadeia simples, deve-se converter seu RNA em DNA complementar, utilizando-se da Transcriptase Reversa, e então amplificá-lo pelo processo padrão da PCR (XAVIER; et al., 2020).

Para a realização do exame, a amostra deve ser coletada com swabs de rayon de haste flexível, na nasofaringe, orofaringe ou ambos. Para nasofaringe, deve-se introduzir o swab delicadamente com movimentos rotatórios, utilizando um swab para cada narina. Para orofaringe, recomenda-se utilização de abaixador de língua, para evitar o contato do swab com a mesma. Após coletada, a amostra deve ser

imediatamente colocada em tubo estéril contendo meio de transporte viral e armazenada a 4°C por até 72 horas. (MORALES; et al., 2020).

Através da técnica de PCR em Tempo Real, é possível amplificar o gene de escolha para diagnóstico da COVID-19, entre eles o gene RdRP, o gene E e o gene N. A escolha deve ser feita de acordo com o primer que será utilizado. Assim, inicia-se a fase de transcrição reversa do DNA, realizando a síntese de DNA complementar a partir da fita inicial de RNA. Nucleotídeos são adicionados à fita na extremidade 3' formando a fita de DNA complementar do RNA viral. As temperaturas, assim como a duração desse processo, podem variar de acordo com o iniciador utilizado, além do RNA alvo e da Transcriptase Reversa (VIEIRA; et al., 2020).

A próxima etapa é a desnaturação dos híbridos de RNA-DNA, onde entra em ação a DNA Polimerase, ao passo que a Transcriptase Reversa deixa de atuar. Para concluir a desnaturação, a câmara reacional deve ser aquecida a 95°C, o que vai fazer com que as duas fitas do DNA molde se separem.

Na etapa de anelamento, a temperatura é reduzida a 58°C, fazendo com que o primer iniciador possa se ligar à fita molde de DNA. Nesse processo, a temperatura varia de acordo com o tamanho da fita que será amplificada.

Na etapa de extensão, uma nova fita de DNA é sintetizada a partir da fita molde, a partir do sentido 5' da fita, acrescentando nucleotídeos na mistura. Nessa fase, a temperatura varia de acordo com a DNA Polimerase escolhida.

Com essas três etapas, finaliza-se o primeiro ciclo, no qual se obtém a dupla hélice do DNA alvo, que será desnaturado para dar início ao próximo ciclo, sendo que ao final de cada ciclo, a quantidade de dupla hélices de DNA dobra, assim permitindo a análise de quantidades extremamente pequenas de amostra (NASCIMENTO; et al., 2010).

Para a leitura do teste, utilizam-se marcadores fluorescentes que se ligam ao DNA complementar produzindo luz que pode ser observada através do termociclador de tempo real. O teste é considerado positivo de acordo com a luminosidade produzida pela amostra. O número de ciclos necessários para atingir essa luminosidade, indica o grau da infecção, ou seja, quanto menos ciclos forem necessários, maior a carga viral presente na amostra (GREEN; et al., 2020).

Para assegurar ainda mais a eficácia do teste, algumas marcas contam com controle negativo ou positivo. Os parâmetros seguidos podem variar de acordo com cada marca. A interpretação dos resultados de acordo com o Applied Biosystems™ COVID 19 Interpretive Software, preconiza a presença de ambos os controles, negativo e positivo, para cada rodada. Para serem considerados como válidos todos os testes devem passar pelos controles. Testes inválidos ou inconclusivos devem ser realizados novamente (Life Technologies Corporation, 2020).

Entre as grandes vantagens da PCR estão sua sensibilidade e especificidade, ou seja, é um teste capaz de detectar quantidades pequenas de material genético, e especificidade verificada frente ao material genético de diversos outros patógenos que podem gerar quadro de sintomas semelhantes. Além disso, o resultado pode ser obtido em poucas horas, o que o torna muito vantajoso frente a uma pandemia (JAWERTH; et al., 2020).

Em contrapartida, a PCR só nos permite detectar o vírus enquanto este ainda estiver em circulação no organismo do paciente, impossibilitando detectá-lo se o paciente já estiver recuperado da infecção (GREEN; et al., 2020). O ideal é realizar o teste entre o terceiro e sétimo dia de sintomas, sendo que em períodos anteriores e posteriores a esses o grau de sensibilidade é reduzido, aumentando a possibilidade de um resultado falso negativo (MALAVÉ, 2020).

#### *Interpretação dos resultados*

Resultado positivo: significa que a amostra é de um paciente atualmente infectado em fase de transmissibilidade.

Resultado negativo: não exclui que o paciente esteja infectado, ou seja, o exame pode ter sido realizado antes ou após o período indicado, ou a amostra pode ter sido insuficiente. Nesse caso, devem-se monitorar os sintomas e repetir o exame (GREEN; et al., 2020).

### **3.2 Anticorpos (Imunoglobulinas) e testes imunológicos**

Para a correta interpretação dos resultados dos testes para COVID-19, o profissional de saúde deve conhecer os anticorpos, seus tipos, o mecanismo de ação em que estão envolvidos e o tempo para sua produção, pois são agentes atuantes na resposta imune adaptativa, podendo assim orientar melhor o paciente na escolha correta dos testes de acordo com sua janela imunológica para evitar falso-negativos ou falso-positivos.

Conhecidos como a linha de defesa do organismo, os anticorpos são as proteínas que vão identificar algum agente estranho e destruí-lo, tais como vírus e bactérias, ou células tumorais. Estão presentes em vários fluidos biológicos, nas superfícies de algumas células como Linfócitos B, ou secretados pelos plasmócitos. Os anticorpos têm várias funções que estão englobadas dentro do sentido de destruição, entre elas a aglutinação, ativação do sistema complemento, opsonização – onde aumentará a fagocitose – na inflamação, e pela citotoxicidade, causada pela secreção das células NK (Natural Killers) (MURO; et al., 2009). Possuem 2 cadeias leves e 2 cadeias pesadas, aonde a região conhecida como Fab se ligará com o antígeno, no qual se terá o epítipo, capaz de gerar a resposta imune. Nas regiões de cadeia leve temos a

interação com as células tais como a fagocitose, a citotoxicidade mediada pelas NK e as ações pelo sistema complemento (DE OLIVEIRA; et al., 2013).

Os anticorpos possuem classes que se destacam de acordo com a resposta imunológica e sua permanência no soro. As imunoglobulinas, a partir de sua ligação específica a um antígeno ou a alguns antígenos proximamente relacionados, são responsáveis por mediar funções efetoras que levarão à lise celular e liberação de moléculas biologicamente ativas para destruição do antígeno (MAYER, 2017)

Destacam-se a IgM, IgG e a IgA específicas contra um determinado antígeno. Anticorpos IgA encontram-se nas mucosas e secreções tais como saliva e suor, sua vida média é baixa, de apenas 6 dias, por isso não é tão usado nos métodos de quimioluminescência e imunocromatografia. Anticorpos IgM se distribuem por toda a corrente sanguínea, e sua resposta imune humoral tem uma vida média de até 7 dias, por isso se encontram na resposta imune primária. Alguns estudos citam que essa imunoglobulina possui maior poder de neutralização que a IgG. Anticorpos IgG são responsáveis pela memória específica contra determinado antígeno, e assim estão relacionados na resposta tardia, em que há uma permanência de vida de até 23-30 dias no soro, além de sua ampla distribuição no organismo, por exemplo, na linfa. (DE OLIVEIRA; et al., 2013).

### 3.3 Quimioluminescência

A quimioluminescência é um método laboratorial que visa quantificar a concentração de anticorpos em uma determinada amostra através de uma reação química que irá gerar luz. Para a análise dos anticorpos relacionados ao SARS-CoV-2, é utilizada a coleta de sangue por punção venosa, em que é recomendado colher a amostra de pacientes assintomáticos e sintomáticos, a partir do 7º dia de sintomas/manifestações clínicas ou caso tenha havido contato com a doença, para descobrir a concentração das imunoglobulinas. O teste pode detectar anticorpos IgM, predominantes na resposta imune primária, que está presente na fase aguda, pois são os primeiros a serem produzidos, a partir do 7º dia, porém apresentam menos especificidade para combater o vírus; assim como as imunoglobulinas IgG, que aparecem tardiamente, na fase de memória, em média de até 30 dias após o contato com o vírus, portanto apresentam mais especificidade para combatê-los; ou IgM e IgG em ambos os casos. Anticorpos IgA que têm função de neutralização e opsonização que estão presentes nas mucosas também são encontrados, porém em escalas menores, devido aos poucos dias que permanecem no soro. Espera-se, que, após 30 dias de infecção, 100% dos pacientes possuam anticorpos totais ou IgG detectáveis (FERREIRA; et al., 2020).

O método de quimioluminescência se baseia na quantidade de luz emitida em uma reação química, essa luz emitida na reação pode ser radiação ultravioleta ou infravermelha (FERREIRA; ROSSI, 2001, 2002).

Nesse método a quantificação dos anticorpos se dá devido à ligação de um marcador luminescente, mais conhecido como cromógeno, que permitirá que substâncias incolores sejam visualizadas e quantificadas pela intensidade de luz produzida.

Existem vários tipos de compostos como a luciferina, lofina e etanodiato de bis (2,4,6 triclorofenila), mas o principal marcador mais utilizado na reação de quimioluminescência é o luminol, responsável pela oxidação que resultará na iluminação tornando-a visível (FERREIRA; ROSSI, 2001, 2002).

Considera-se que, a reação de quimioluminescência como uma técnica quantitativa na concentração de anticorpos, apresenta alta sensibilidade e especificidade, e aparenta ser diretamente proporcional de acordo com a sua intensidade na reação. Essa intensidade da emissão depende da velocidade da reação, da eficiência na geração de moléculas em um estado excitado e do fluoróforo, que pode ser considerado a substância que produz a emissão (FERREIRA; ROSSI, 2001, 2002).

No método de quimioluminescência pode haver algumas discrepâncias, já que os testes sorológicos têm valor insignificante para diagnóstico em casos individuais, ou de interpretação de exposição prévia, em locais onde a prevalência da COVID-19 é baixa e não são fornecidos diagnósticos de infecção atual ou ativa pelo SARS-CoV-2 (SANTINI; et al., 2020).

#### *Interpretação dos resultados*

Resultado positivo: IgM positivo e IgG negativo indicam infecção aguda; IgM e IgG positivos indicam infecção em processo, com transição para imunidade adquirida, com aumento progressivo de IgG; IgM negativo e IgG positivo indicam imunidade adquirida, ou seja, o paciente já teve contato com o vírus previamente;

Resultado negativo: IgM e IgG negativos indicam que, ou não houve infecção, ou o organismo ainda não teve tempo suficiente de produzir os anticorpos.

Discrepâncias: há casos em que a permanência de anticorpos IgM prevaleceu por mais de 7 semanas, sem tempo definido para sua negatificação; IgG com falso-negativos ou IgG indeterminados, mesmo após 50 dias do início dos sintomas, com qRT-PCR positivo; e resultados de IgG que começam a positivar após 20 dias do início de sintomas, com crescimento lento, sem previsão de chegar ao resultado platô de concentração de IgG. E até mesmo em alguns pacientes, não foram nem detectados positividade de IgM, nem mesmo na fase ativa da infecção (FERREIRA; et al., 2020).

### **3.4 Imunocromatografia**

Classificado como um teste rápido, econômico e de fácil interpretação, além de sua leitura ser vista a olho nu, a imunocromatografia é um teste qualitativo usado para a detecção de muitas doenças infecciosas.

inclusive para detecção dos anticorpos específicos IgM e IgG do SARS-CoV-2 e através de método de duplo anticorpo (sanduíche), aprimorado com ouro coloidal, para determinação qualitativa do antígeno de COVID-19.

#### 3.4.1 Teste rápido para anticorpos

Para realizar a técnica deve-se ter a informação de que as amostras e os produtos devem estar em temperatura ambiente no momento de realização do teste. E, para cada bula na qual está prescrita na descrição de cada fabricante, sugere-se o uso de sangue (polpa digital ou punção venosa), soro ou plasma humano. O teste deve ser feito a partir do 8º dia dos sintomas iniciais ou se o indivíduo teve contato há pelo menos 10 dias com pessoas que tiveram exposição confirmada com a COVID-19, pois é necessário que o organismo crie os anticorpos específicos para serem possivelmente detectados nessa metodologia (LIMA; et al., 2020).

Seu princípio se baseia na utilização de uma solução tampão (reagente) em que é colocada a dose recomendada, o poço de amostra, onde também se coloca a quantidade recomendada do mesmo (sangue total, soro ou plasma), a parte intermediária onde estará o conjugado de SARS-CoV-2 com o antígeno corante, a utilização de uma matriz de membrana de nitrocelulose, ligada a uma tira de acetato transparente, a qual é chamada de área de teste, pois é nesse lugar que aparecerá uma linha única, caso seja detectado apenas um anticorpo ou duas linhas se forem detectados simultaneamente (IgG e IgM), e área de controle, aonde ocorrerá o lugar de controle da reação para permitir que o teste seja válido. Em alguns modelos há presença somente da linha “T” e outros ela está indicada pelas linhas que sinalizam os anticorpos (LIMA; et al., 2020).

#### *Leitura dos resultados*

Para a interpretação dos resultados nessa metodologia, espera-se, normalmente entre 15 e 20 minutos, dependendo do kit de cada fabricante. A linha com marcação de controle sempre deve aparecer em todos os testes; caso a linha de controle não apareça no teste, o mesmo deverá ser considerado inválido e, portanto, descartado. O kit também disponibilizará a marcação indicada para os anticorpos IgM e IgG para a detecção de cada um ou ambos os casos.

Na marcação apenas da linha IgM positivo indica que a infecção pelo SARS-CoV-2 foi recente. Anticorpos IgG com marcação na linha positiva do teste mostra uma infecção mais antiga, há pelo menos, duas semanas (LIMA, et al., 2020). Quando o teste mostra a marcação da linha de ambos os anticorpos, tanto IgM quanto IgG, mostra a infecção pelo SARS-CoV-2 e que o organismo está numa fase de transição, se tornando mais relacionada com a produção de anticorpos IgG e, por isso, os cuidados devem ser mantidos.

### 3.4.2 Teste rápido na detecção de antígenos

Trata-se de um teste imunocromatográfico para detecção qualitativa específica de antígenos (Ag) de SARS-CoV-2 em amostras de swab de nasofaringe. Esse exame possui menor tempo de resultado em comparação ao RT-PCR. A fim de detectar o antígeno, emprega-se um anticorpo de captura, ligado à matriz e um anticorpo marcado com partículas coloridas que é específico para o antígeno pesquisado.

#### *Leitura dos resultados*

Uma linha colorida deverá aparecer na seção superior das janelas de resultado para demonstrar que o teste está funcionando corretamente. Essa linha se refere à linha controle (C). Outra linha colorida poderá aparecer na seção inferior da janela de resultado. Essa linha se refere à linha teste (T) do antígeno de SARS-CoV-2. Na presença de uma linha teste ainda que fraca ou de qualquer intensidade, o resultado é considerado reagente, indicando infecção em curso, com presença do vírus. A sensibilidade pode sofrer variações conforme o fabricante (com valores entre 70% a superiores a 99%), e está vinculada ao período da obtenção da amostra.

A ausência da linha é lida como não-reagente, indicando que não foi possível identificar o antígeno; o que deve ser confrontado ao histórico do paciente para permitir excluir o diagnóstico.

### 3.5 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

O ELISA, que vem do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent- Assay, é um importante ensaio imunoenzimático que vem sendo utilizado como um dos principais testes sorológicos na detecção da COVID-19. Assim como outros testes, o ELISA demanda profissionais capacitados para sua realização (DIAS; et al., 2020); Muitos pontos devem ser observados, como cuidados com os reagentes (se estão dentro do período de validade e estocagem), calibração de pipetas e demais aparelhos e limpeza no preparo de soluções para não haver contaminações. Para essa técnica, a sensibilidade para a detecção de imunoglobulinas que são específicas, como a IgM e IgG, é de 2 a 3 semanas após início dos sintomas (BAOQING; et al., 2020).

Apresenta uma grande sensibilidade e especificidade, pois tem capacidade de quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, tanto direta quanto indiretamente através de suas reações enzimáticas, que destacamos a peroxidase, responsável por catalisar a reação de desdobramento de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Além de sua praticabilidade, as quantidades de proteínas são detectadas em nanogramas.

Nas microplacas, há vários poços nos quais ocorrem a ligação antígeno-anticorpo, proporcionando a reação (UFRGS, 2015).

No ELISA direto, procura-se um antígeno presente no soro do paciente. Portanto, deve-se colocar na placa um anticorpo já fixado no kit reagente. No caso de pacientes contaminados, os antígenos presentes no soro irão se ligar aos anticorpos da placa. Diante disso, um segundo anticorpo ligado a uma enzima será adicionado para evidenciar a ligação do anticorpo do kit mais o antígeno do soro. Na última etapa, será adicionado um substrato próprio para a ação enzimática. A enzima, por sua vez, quebrará o substrato revelando a reação colorimétrica.

No método de ELISA Indireto, as placas são pré incubadas com os antígenos contra os quais quer se detectar a presença de anticorpos. Logo após, será feita uma lavagem para retirar os antígenos não aderidos. Em seguida, adiciona-se a amostra onde se pretende detectar um anticorpo específico realizando-se uma segunda lavagem, para, posteriormente, adicionar o segundo anticorpo marcado com enzima. Após uma terceira e última lavagem, adiciona-se o substrato e o cromógeno sendo, por fim, analisada a reação enzimática (MOREIRA; et al., 2011).

#### *Leitura dos resultados*

A interpretação dos resultados segue os mesmos princípios relacionados ao tipo de imunoglobulina reagente, como já expresso anteriormente neste trabalho, com ensaios disponíveis para detecção de IgA, IgM e/ou IgG, o que pode indicar infecção recente, período de soroconversão ou infecção/contato passado (IgG).

### **3.6 Evolução do quadro clínico, janela imunológica e os exames**

Um dos aspectos que devem ser avaliados a fim de obter resultados confiáveis nos testes diagnósticos é o momento adequado para obtenção da amostra, considerando o tempo decorrido desde a possível contaminação, manifestação dos sintomas (quando ocorre, uma vez que existem portadores assintomáticos) e a completa evolução do quadro. Em se tratando do SARS-CoV-2, sobressaem-se algumas dificuldades para sua detecção, como período de incubação e progressão do aparecimento de sintomas variáveis, que podem ainda ser confundidos com os sintomas quadro respiratório causado por outros agentes patogênicos. Assim também, há casos de transmissibilidade em pacientes assintomáticos que, por vezes, não estão cientes da infecção, e assim não buscam a detecção através dos testes (SERAFIM, et al., 2020).

Para a realização da coleta para diagnóstico pela qRT-PCR são indicados o 3º e 5º dia após o início dos sintomas, podendo ser estendido até o 7º dia. A mesma recomendação é observada nos testes rápidos para detecção de antígenos, para uma reduzir a possibilidade de falsos negativos. (Sec Est Saúde ES, 2020). Nos métodos sorológicos, deve-se considerar a janela imunológica, que corresponde ao intervalo entre o período da infecção e a produção de anticorpos pelo organismo após o contato com o agente infeccioso. Assim, para detecção de anticorpos anti- SARS-CoV-2 o tempo de 10 dias após início dos sintomas tem sido indicado; ou 15 dias após a possível contaminação. Na quimioluminescência, o tempo médio para a execução da técnica é a partir do 7º dia de sintomas/manifestações clínicas, dependendo dos fatores da janela imunológica do paciente. (FERREIRA; et al., 2020). Na ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), é de 2-3 semanas a partir do início de sintomas (BAOQING; et al., 2020). Já nos testes rápidos, como a imunocromatografia para anticorpos, é aconselhável fazer o teste a partir do 8º dia de sintomas iniciais ou caso tenha havido contato com pessoas que já foram confirmadas com a COVID-19 (LIMA; et al., 2020).

### **3.7 Exames laboratoriais complementares**

Além dos testes empregados na detecção do vírus em questão, há exames complementares, hematológicos e bioquímicos, para o monitoramento da evolução da patologia. Entre as alterações laboratoriais mais frequentes, verifica-se o aumento de dímero-D, que é produto da degradação da fibrina, bem como da PCR (Proteína C Reativa), que indica processos inflamatórios ou infecciosos.

A contagem total de leucócitos apresenta variação, com relatos de diminuição e aumento, com presença de linfopenia acentuada nos estágios iniciais, e neutrofilia relacionada com mau prognóstico. A hemoglobina apresenta diminuição, enquanto a taxa de sedimentação de eritrócitos aparece aumentada. Na parte de coagulação, observa-se plaquetopenia e prolongamento do Tempo de Protrombina (TP) (XAVIER; et al., 2020).

Em relação às dosagens bioquímicas, pode-se notar alterações hepáticas, como aumento da alanina aminotransferase (TGP), aspartato aminotransferase (TGO) e bilirrubinas (FLEURY; et al., 2020).

### **3.8. Fatores interferentes**

O primeiro passo na confirmação de infecção por SARS-CoV-2 é a identificação do lapso temporal; é necessário considerar a data do possível contato e a data da manifestação dos sintomas. Com isso, pode-

se optar por testes que visam identificar o agente etiológico (RT-PCR ou COVID Ag), ou caso decorrida mais de uma semana dos sintomas, buscar a constatação dos anticorpos.

Não obstante, existem fatores técnicos importantes a serem considerados relacionados à:

- ✓ Amostra: coleta adequada, volume suficiente, processamento e transporte adequados. O tipo de amostra coletada é baseado no teste que se pretende realizar e nas instruções do fabricante. Alguns dos tipos de espécimes biológicos não serão apropriados para eficácia máxima das análises e todos os testes para SARS-CoV-2 devem ser realizados em consulta com um profissional de saúde (CDC, 2021);
- ✓ Reagentes: validade, temperatura, armazenamento e dosagem correta;
- ✓ Procedimento: perícia adequada para realização dos processos analíticos necessários a cada tipo de teste;
- ✓ Interpretação dos resultados: avaliação da leitura dos resultados frente ao período de obtenção da amostra e de acordo com o histórico de cada caso.

Existem ainda fatores específicos de cada tipo de análise, como por exemplo, a presença de inibidores (RT-PCR e heparina) que pode provocar falsos negativos ou resultados inválidos (MORALES, 2020).

#### **4. Considerações Finais**

Muitos requisitos devem ser observados para escolha e realização de quaisquer testes auxiliares no diagnóstico da COVID-19. No mesmo sentido, um olhar abrangente do histórico do paciente é fundamental para correta interpretação dos resultados. Existem um gama de exames, de diferentes fabricantes e assim, valores também diferenciados nos parâmetros que servem como base para confiabilidade analítica dos exames e resultados.

Nesta direção, a sensibilidade traduz a capacidade de identificação da resposta; enquanto a especificidade está relacionada à propriedade de diferenciação do agente dentre outros similares; portanto, quanto maiores a sensibilidade e a especificidade, menores as chances de falsos negativos. Todavia, uma sensibilidade aumentada e uma baixa especificidade podem ocasionar resultados falso positivos.

Em se tratando de acurácia, o qRT-PCR se sobressai até o presente momento devido à sua capacidade de detecção de fase aguda, todavia, por se tratar de um teste molecular, há maior despesa além de necessitar de maquinaria específica, equipe e laboratório capacitados para elaboração do exame em relação aos testes sorológicos e imunocromatográficos.

Em relação à janela imunológica, os métodos por sorologia são indicados entre 8 a 14 dias de sintomas, quando as imunoglobulinas possuem uma taxa plasmática considerável. Diferentemente, a RT-PCR e

COVID-19 Ag, devem ser realizados no período inicial dos sintomas, entre 3 a 4 dias, já que esses métodos identificam material viral na amostra coletada.

Não obstante o método utilizado, é necessária uma anamnese detalhada, atentando ainda para os exames complementares no diagnóstico. Apesar dos parâmetros diferenciados de cada teste, fatores interferentes pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos devem ser sempre observados a fim de reduzir índice de falsos resultados nas análises.

Nos últimos meses, diversos testes para detecção da COVID-19 foram desenvolvidos a fim de ampliar a abrangência de testagem ao redor do mundo. Apesar da qRT-PCR ser considerada “padrão ouro” para o diagnóstico da infecção, isso não a isenta de falhas, principalmente se o protocolo não for seguido à risca. Portanto, este teste é útil para diagnóstico quando realizado no início da infecção.

O teste rápido para antígenos rastreia a presença de proteínas do vírus (SARS-CoV -2) frente a infecção. Este teste pode ser realizado a partir do 3º dia de provável exposição ou contato com caso confirmado de COVID-19.

Os testes para anticorpos podem ser aplicados em casos de pacientes com quadro tardio (após 7º dia do início dos sintomas). Em geral, os testes de anticorpos para SARS-CoV-2 possuem melhor desempenho quando aplicados para rastrear indivíduos que já foram expostos e imunizados, inclusive assintomáticos, sendo assim de grande utilidade para inquéritos epidemiológicos. Cabe lembrar, no entanto, que a resposta imunológica é diversificada entre os indivíduos, está atrelada à condição clínica de cada paciente e ocorre em um intervalo após a exposição, que deve ser observado para indicação deste tipo de exame.

Frente à atual situação mundial de pandemia da COVID-19, fica evidente a importância da atuação de profissionais especializados, seja na pesquisa, seja na testagem da doença. Os resultados destes testes devem ser interpretados levando-se em conta as informações disponíveis sobre a avaliação clínica e histórico do paciente. As informações obtidas a partir dos exames precisam ser corretamente interpretadas a fim de contribuir para tomada de decisões no controle da transmissão da doença, prognóstico e tratamentos, bem como perspectivas de prevenção, desenvolvimento e aplicação de agentes imunizantes.

## **5. Referências Bibliográficas**

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 19 Agosto 2020. Disponível em: <<https://coronavirus.ceara.gov.br/project/testes-para-covid-19-perguntas-e-respostas/>>. Acesso em: 28 Agosto 2020.

BAOQING, S.; YING, F.; XIAONENG, M.; et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. Taylor & Francis, v.9, p. 941-943, Abril 2020.

CDC, Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Updated Jan. 6, 2021. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html#collecting>>

DE CAMARGO, C. F. ; DA SILVA, P. R. Q. Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em diagnóstico molecular, 18 Agosto 2020. Disponível em: <<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLORENCIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>. Acesso em: 24 Setembro 2020.

DE OLIVEIRA, M. B. S. C.; RIBEIRO, F. C.; VIZZONI, A. G. Conceitos básicos e aplicados em imunohematologia. Rio de Janeiro, Editora EPSJV, 2013. p. 16-18, 21, 45-50.

DIAS, V. M. D. C. H; CARNEIRO, M; MICHELIN, L; et al. Testes sorológicos para COVID-19: Interpretação e aplicações práticas. Journal Infection Control, v. 9, n. 2, p. 1-11, Junho 2020. ISSN 2316-5324.

FERREIRA, C. E. D. S.; WELTER, E. A.; et al. Testes sorológicos para COVID-19: Interpretação e aplicações práticas. Official Journal of the Brazilian Association of Infection Control and Hospital Epidemiology, v. 9, n. 2, p. 5-6, Junho 2020.

FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. 6º. ed. Campinas: Química Nova, v. 25, 2001,2002.

FLEURY, M.; MAUREN, I. Alterações laboratoriais em pacientes com Covid-19. SBAC Associação Brasileira de Análises Clínicas, 26 Março 2020. Disponível em: <<https://www.sbac.org.br/blog/2020/03/26/alteracoes-laboratoriais-em-pacientes-com-covid19/>>. Acesso em: 29 Setembro 2020.

GREEN, K.; WINTER, A.; DICKINSON, R.; et al. What tests could potentially be used for the screening, diagnosis and monitoring of COVID-19 and what are their advantages and disadvantages?. Evidence-Based Medicine, 20 Abril 2020. Disponível em: <<https://www.cebm.net/covid-19/what-tests-could-potentially-be-used-for-the-screening-diagnosis-and-monitoring-of-covid-19-and-what-are-their-advantages-and-disadvantages/>>. Acesso em: 17 Setembro 2020.

GRUBER, A. Jornal da USP, 14 Abril 2020. ISSN 2525-6009. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/artigos/covid2-o-que-se-sabe-sobre-a-origem-da-doenca/>>. Acesso em: 18 Agosto 2020.

GUO, Y.-R.; CAO, Q.-D.; et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019. Militar Medical Research, v. 7, n. 11º, p. 4, 2020.

JAWERTH, N. Office of Public Information and Communication. International Atomic Energy Agency, 27 Março 2020. Disponível em: <<https://www.iaea.org/newscenter/news/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr>>. Acesso em: 23 Setembro 2020.

Life Technologies Corporation, Pleasanton, California, Estados Unidos da América. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/latinamerica/2020/Promotions/Brasil/TaqPath%20COVID-19%20CE-IVD%20RT%20PCR%20Kit.pdf>>. Acesso em: 17 Setembro 2020.

LIMA, F. D. S. S.; FRANCELINO, E. V.; et al. Univerdade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. ISSN 978-65-00-04464-5. Disponível em: <<https://ffoe.ufc.br/wp-content/uploads/2020/06/guia-tecnico-ffoe.pdf>>. Acesso em: 10 Outubro 2020.

Instituto Adolfo Lutz, 18 Agosto 2020. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/coronavirus/report-3.pdf>>. Acesso em: 15 Setembro 2020.

MALAVÉ, M. M. Testes para a Covid-19: como são e quando devem ser feitos. Fundação Oswaldo Cruz, 6 Julho 2020. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/testes-para-covid-19-como-sao-e-quando-devem-ser-feitos>>. Acesso em: 16 Setembro 2020.

MAYER, G. Microbiology and Immunology on line, University of South Carolina School of Medicine. Dec, 2017. Disponível em:< <https://www.microbiologybook.org/mayer/IgStruct2000.htm>>. Acesso em 11 de janeiro de 2021.

MESA, J. F. C.; CASTILLO, A. A. V.; TORRES, J. C. Real-time PCR-based SARS-CoV-2 detection, 7 Agosto 2020. Disponível em : <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/707/1558d>. DOI: <<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.707>>. Acesso em: 10 Setembro 2020.

MORALES, P. S. Coronavírus: orientações de coleta, armazenamento e transporte do material para a identificação, 09 Março 2020. Disponível em: <<https://pebmed.com.br/coronavirus-orientacoes-de-coleta-armazenamento-e-transporte-do-material-para-a-identificacao/>>. Acesso em: 3 Outubro 2020.

MOREIRA, R.; CAPELA, I.; ALMEIDA, B.; et al. Repositório Instituto Politécnico de Viseu. [Online], 16 Outubro 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ipv.pt/bitstream/10400.19/1422/1/3%20Moreira%20at%20al%20Metodo%20Elisa%20CIEV%202011.pdf>>. DOI: <http://hdl.handle.net/10400.19/1422>>. Acesso em: 15 Agosto 2020.

MURO, L. F.; FERREIRA, L. L.; GONZAGA, P. A. L.; et al. Relação Antígeno-Anticorpo. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Janeiro 2009. Ano VII, Edição XII, p. 1-4. ISSN: 1679-7353.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. Revista brasileira de medicina, Santo André , p. 7-19, Novembro 2010. ISSN 0034-7264.

OLIVEIRA, T. L. Quando as doenças viram números: as estatísticas da Covid-19. Casa de Oswaldo Cruz, 16 Junho 2020. Disponível em: <<http://coc.fiocruz.br/index.php/pt/todas-as-noticias/1809-especial-covid-19-quando-as-doencas-viram-numeros-as-estatisticas-da-covid-19.html?tmpl=component&print=1&page=#.X53ArlhKi01>>. Acesso em: 5 Setembro 2020.

Organização Pan-Americana da Saúde. Folha Informativa: COVID-19- Escritório da OPAS e da OMS no BRASIL, 13 Agosto 2020. Disponível em:

<[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875)>. Acesso em: 14 Agosto 2020.

RITCHIE, H.; OSPINA, E. O.; BELTEKIAN, D.; et al. Coronavirus (Covid-19) Testing. Our World In Data, 30 Outubro 2020. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/coronavirus-testing>>. Acesso: 31 Outubro 2020.

SANTINI, M., BOAVENTURA, V.; BARRAL, A.; et al. Considerações sobre o uso e a interpretação dos testes diagnósticos na Covid-19, 6 Julho 2020. Disponível em:

< <https://testecovid19.org/wp-content/uploads/2020/07/Considerac%C3%A7o%C3%83es-sobre-testes-DX-COVID-2020-07-06-v3.pdf>>. Acesso em: 10 Setembro 2020.

Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo, 13 Agosto 2020. Disponível em: <<https://saude.es.gov.br/Media/sesa/coronavirus/Notas%20T%C3%A9cnicas/NOTA%20T%C3%89CNICA%20COVID.19%20N.%2027.20.%20Testes%20Laboratoriais%20Coronavirus.pdf>>. Acesso em: 10 Setembro 2020.

SERAFIM, M.; GASPARINI, M.; PEREIRA, V, 7 Maio 2020. ECO Diagnóstica . Disponível em: <[http://ecodiagnostica.com.br/wp-content/uploads/2020/05/003\\_revisao\\_sorologia\\_COVID-19\\_ECO\\_07052020.pdf](http://ecodiagnostica.com.br/wp-content/uploads/2020/05/003_revisao_sorologia_COVID-19_ECO_07052020.pdf)>. Acesso em: 2 Outubro 2020.

Thermo Fisher Scientific. What is an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)? Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#2>>. Acesso em: 21 Setembro 2020.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Teste de ELISA. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/labvir/material/aulap10.pdf>>. Acesso em: 30 Setembro 2020.

VIEIRA, L. M. F.; EMERY, E.; ANDRIOLO, A. COVID-19: laboratory diagnosis for clinicians. An updating article, 22 Junho 2020. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-31802020000300259](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-31802020000300259)>. DOI: <<https://doi.org/10.1590/1516-3180.2020.0240.14052020>>. Acesso em: 1 Outubro 2020.

XAVIER, A. R.; SILVA, J. S.; ALMEIDA, J. P. C. L.; et al. COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus, 1 Julho 2020. Disponível em: <[https://www.scielo.br/pdf/jbpml/v56/pt\\_1676-2444-jbpml-56-e3232020.pdf](https://www.scielo.br/pdf/jbpml/v56/pt_1676-2444-jbpml-56-e3232020.pdf)>. DOI: <<https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200049>>. ISSN: 1678-4774. Acesso em: 22 Setembro 2020.

