

## Diretrizes para laboratórios sobre detecção e diagnóstico da infecção pelo vírus COVID-19

30 de março de 2020

Os coronavírus são um grupo de vírus RNA altamente diversos da família *Coronaviridae* que se dividem em quatro gêneros – alfa, beta, gama e delta – e causam doença que varia de leve a grave em humanos e animais (1-3). Existem coronavírus humanos endêmicos, como os alfacoronavírus 229E e NL63, e os betacoronavírus OC43 e HKU1, que podem causar síndrome gripal ou pneumonia em humanos (1,3). No entanto, surgiram dois coronavírus zoonóticos, causando doença grave em humanos: coronavírus que causa síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), em 2002-2003, e coronavírus que provoca síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (1-5).

Em janeiro de 2020, o agente etiológico responsável por um agregado de casos (*cluster*) de pneumonia grave em Wuhan, China, foi identificado como sendo um novo betacoronavírus, diferente do SARS-CoV e MERS-CoV (6). Em 11 de fevereiro de 2020, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) anunciou que o vírus foi denominado novo coronavírus que causa síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) (7). Porém, no mesmo dia, a OMS denominou a doença como doença do novo coronavírus COVID-19 (8). Para fins de comunicação, iremos nos referir ao vírus como “o vírus responsável pela COVID-19” ou “o vírus COVID-19”. Sequências genômicas completas do vírus COVID-19 foram publicadas e diferentes protocolos de detecção molecular foram desenvolvidos, porém não estão totalmente validados ainda (9). No entanto, dada a atual circulação do vírus COVID-19 na região das Américas, a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) recomenda aos Estados Membros que garantam a identificação oportuna de casos suspeitos, a coleta e envio de amostras a laboratórios de referência, e a implementação de protocolos de detecção molecular, de acordo com a capacidade do laboratório.

Em 19 de março de 2020, a OMS atualizou sua orientação provisória sobre os testes laboratoriais para doença do novo coronavírus (COVID-19) em casos suspeitos em humanos, que incluía informações sobre coleta e envio de amostras, testes laboratoriais e notificação de casos e resultados de testes (9). A OMS também atualiza as definições de casos suspeitos conforme necessário (10).

### Coleta de amostras e envio adequado

#### Coleta de amostras

As amostras devem ser coletadas por pessoal treinado, seguindo todas as instruções de biossegurança, inclusive o uso de equipamentos de proteção individual adequados para garantir as precauções-padrão, de contato e para aerossol. Em especial, a equipe deve realizar a higienização adequada das mãos, usar bata cirúrgica, respirador (N95 ou FFP2), proteção para os olhos (óculos de proteção) ou para o rosto (proteção facial), e luvas (11).

## Amostras de secreção respiratória

As amostras recomendadas são aquelas do trato respiratório inferior, incluindo escarro, lavado broncoalveolar e aspirado traqueal (quando possível, de acordo com os critérios médicos). No entanto, quando não for possível realizar a coleta de uma amostra do trato respiratório inferior, as amostras do trato respiratório superior também podem ser usadas. Em geral, recomenda-se a coleta combinada de um *swab* nasofaríngeo e *swab* orofaríngeo (os *swabs* devem ser colocados e transportados no mesmo tubo contendo meio de transporte universal ou viral) (9).

Se a amostragem dos contatos assintomáticos for incluída nas diretrizes nacionais, é preferível usar amostras do trato respiratório superior.

Deve-se usar somente *swabs* de material floculado de poliéster ou Dacron. Os protocolos para a produção interna de meios de transporte viral estão disponíveis mediante solicitação para o escritório regional da OPAS. Além disso, deve-se usar solução fisiológica estéril se o meio de transporte não estiver disponível (consulte abaixo as considerações sobre transporte de amostras).

## Envio de amostras

As amostras de secreção respiratória devem ser mantidas sob refrigeração (4-8°C) e enviadas ao laboratório, onde serão processadas no prazo de 24-72 horas após a coleta. Se as amostras não puderem ser enviadas dentro desse período, recomenda-se o congelamento a -70°C (ou menos) até que as amostras sejam enviadas (garantindo a manutenção da cadeia fria). Se os *swabs* forem colocados em solução fisiológica estéril em vez de meio de transporte viral, a amostra deve ser enviada com prioridade.

O envio de amostras de casos suspeitos a laboratórios de referência ou centros colaboradores fora do país e por via aérea deve ser feito em conformidade com todas as normas internacionais (IATA) de transporte de substâncias biológicas, categoria B (12).

## Outros tipos de amostras

O vírus COVID-19, bem como o SARS-CoV e MERS-CoV, foi detectado em outros tipos de amostras, como fezes e sangue (9). No entanto, a dinâmica viral nessas amostras não foi completamente caracterizada. Amostras de tecido dos pulmões ou do trato respiratório também foram úteis para a detecção molecular, desde que haja condições adequadas para realizar a necropsia, especialmente em termos de proteção respiratória. Amostras de sangue dos casos agudos e convalescentes podem ser úteis, à medida que os testes sorológicos ficarem disponíveis (veja abaixo).

## Testes laboratoriais

Diretrizes de biossegurança para o manuseio de amostras de casos suspeitos no laboratório foram publicadas em outros documentos (12, 13).

## Métodos moleculares

A confirmação de rotina de casos de COVID-19 é baseada na detecção do ácido nucleico do vírus COVID-19 (RNA) por ensaios de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR).

### Extração de RNA

O RNA pode ser extraído das amostras mencionadas acima, usando qualquer kit ou protocolo-padrão de extração. Em geral, a etapa de lise da amostra na extração de RNA inativa qualquer vírus vivo. Por esse motivo, as amostras hemolisadas geralmente são consideradas não infecciosas. A inativação do vírus COVID-19 através de lise da amostra foi verificada por alguns kits comerciais (14).

As amostras de catarro exigem liquefação antes da extração molecular (15), embora as amostras de tecido exijam lise e homogeneização.

### Protocolos de detecção molecular

A OMS disponibilizou diversos protocolos de diagnóstico molecular (usando RT-PCR) no seguinte link: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>.

Observe que a inclusão de nomes de fornecedores ou fabricantes nos protocolos não significa que eles contem com a preferência/o endosso da OMS. Além disso, esses protocolos ainda não foram validados através do processo da OMS.

Através do esforço dos Estados Membros da OPAS, todos os laboratórios nacionais com a capacidade de realizar testes moleculares, inclusive os *National Influenza Centers* (NIC) [Centros Nacionais de Influenza], foram treinados no uso do primeiro protocolo disponibilizado pela OMS, desenvolvido pela *Charité – Universitätsmedizin Berlin Institute of Virology*, em Berlim, na Alemanha. A avaliação do protocolo foi publicada (16) e um protocolo de trabalho está disponível no seguinte link: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf>.

O protocolo baseia-se na detecção de dois alvos no genoma do vírus: o gene E como rastreamento, seguido da confirmação de genes E positivos através da detecção do gene RdRP usando a sonda genética P1 e/ou o P2. O ensaio E é específico para todos os vírus relacionados ao SARS-CoV (ou seja, SARS-CoV, vírus COVID-19, e vírus associados a morcegos), embora o ensaio RdRP usando a sonda genética P2 detecta somente o vírus COVID-19. Reagentes específicos (primers, sondas e controles positivos) e protocolos de trabalho para esses ensaios foram distribuídos pela OPAS/OMS em toda a região.

Ensaio moleculares adicionais estão disponíveis e podem ser realizados em plataformas abertas (ou “manuais”) ou fechadas (ou seja, com kits que funcionem somente em plataformas proprietárias e automatizadas). Eles incluem ensaios que foram aprovados para comercialização pelas autoridades regulatórias nacionais (em especial, aquelas consideradas pela OMS como SRA [*Stringent Regulatory Authority*] para acelerar a pré-qualificação de testes diagnósticos *in vitro*). A OMS também está analisando os pedi-

dos para inclusão na *Emergency Use Listing* (EUL) [Lista de Itens de Uso Emergencial] de ensaios para a detecção do ácido nucleico do vírus COVID-19 (17). Sob a supervisão das autoridades sanitárias nacionais e com o apoio técnico dos laboratórios nacionais de saúde pública e *National Influenza Centers* [Centros Nacionais de Influenza], esses testes podem ser usados em unidades de saúde com a capacidade necessária ou em laboratórios descentralizados.

## Implementação e interpretação

No caso de confirmação laboratorial de casos, apesar de se recomendar a detecção de dois alvos genéticos diferentes (E seguido de RdRP, conforme descrito acima para o protocolo Charité), uma vez que a circulação do vírus COVID-19 esteja estabelecida e disseminada em uma dada área/país, não é mais necessário realizar o teste de PCR para os dois genes. Sendo assim, pode-se fazer a confirmação através da detecção de um único gene-alvo, caso as curvas e outros parâmetros de garantia de qualidade sejam ótimos. Os genes E ou RdRP podem ser usados para o diagnóstico; apesar disso, o PCR para o gene E demonstrou uma sensibilidade levemente mais alta, portanto recomendamos priorizar o gene E como o alvo a ser selecionado.

Geralmente, a detecção molecular do vírus COVID-19 usando protocolos bem desenhados é bastante específica; portanto, um resultado positivo confirma a detecção do vírus. Caso contrário, um resultado negativo pode nem sempre significar a ausência da infecção pelo vírus COVID-19 (9). Diversos motivos podem explicar um resultado negativo em uma pessoa infectada com o vírus COVID-19, principalmente os seguintes:

- Problemas de qualidade, manuseio, transporte e/ou armazenamento das amostras (para controlar isso, pode-se realizar a detecção qualitativa de um gene humano de referência (gene *housekeeping*) [ex. RNase P (18)]).
- Baixa qualidade ou falha na extração da amostra, presença de inibidores de PCR no RNA extraído (para controlar isso, pode-se usar um controle de extração, ou então a detecção de um gene *housekeeping*, conforme mencionado acima).
- A amostra foi coletada em um momento em que o paciente não estava excretando quantidades suficientes do vírus como, por exemplo, bem no início ou bem no final da infecção (esse ponto é particularmente relevante, pois a dinâmica da presença viral nos diferentes tipos de amostras ainda não foi completamente estabelecida).
- Como com qualquer ensaio de detecção molecular, as mutações do vírus nas regiões que são alvo dos ensaios podem afetar a sensibilidade da detecção.

## Métodos sorológicos

Ensaio baseado na detecção de anticorpos IgM / IgG podem dar suporte aos estudos de soroprevalência e investigação do surto. Diversos ensaios (tanto os testes de diagnóstico rápido como ELISA) estão disponíveis para a detecção de anticorpos IgM / IgG e são comercializados para a detecção de infecções pelo vírus COVID-19. No entanto, até hoje, esses testes não são recomendados para uso.

Esses testes podem apresentar limitações devido à reatividade cruzada com outros coronavírus que normalmente estão presentes na comunidade e que tornam a interpretação dos resultados mais difícil (19). Além disso, as dinâmicas de produção e resposta dos anticorpos durante os diferentes estágios de infecção ainda não estão bem estabelecidas, o que limita ainda mais o uso desses testes. Alguns estudos demonstraram que durante os primeiros 6-7 dias desde o início dos sintomas, menos de 40% dos pacientes possuem anticorpos detectáveis (20). Portanto, os testes sorológicos não devem ser usados para descartar um caso durante os primeiros dias da doença. De maneira similar, a detecção de anticorpos após o dia 7 indica somente que houve contato anterior com o vírus, mas não confirma a presença ou excreção do vírus. Os anticorpos detectados podem resultar de uma infecção anterior e não da infecção aguda para a qual o diagnóstico está sendo solicitado.

Muitos produtos estão sendo comercializados para a detecção de anticorpos (IgM e/ou IgG) induzidos pela infecção pelo vírus COVID-19, inclusive testes rápidos de detecção de anticorpos/antígenos (TRDAs). Qualquer teste desse tipo deve ser validado e seu desempenho em termos de especificidade e sensibilidade deve ser avaliado. Atualmente e por solicitação da OMS, estão sendo realizados processos de avaliação e de eventual validação para alguns desses testes. No entanto, até agora, nenhum teste possui uma validação independente e, por isso, deve-se tomar cuidado com seu uso. Além do mais, o uso de testes rápidos não é recomendado, pois (além do que já foi explicado anteriormente) esses tipos de teste podem ter baixa sensibilidade (veja abaixo). Por esses motivos, a detecção de anticorpos não é considerada (ainda) um teste adequado para a confirmação ou diagnóstico de casos de COVID-19. Protocolos sorológicos também estão sendo desenvolvidos internamente por diversos laboratórios.

## Detecção de antígenos

Durante os primeiros dias após o início dos sintomas (aproximadamente 1 a 5), são geradas proteínas virais que podem ser detectadas por diversos testes (ex.: ELISA, imunofluorescência). Em geral, esse tipo de ensaio possui especificidade aceitável (dependendo do ensaio), portanto sua detecção pode ser usada como critério de confirmação (juntamente com a definição do caso, histórico clínico e histórico epidemiológico) e para tomar decisões de saúde pública (ex.: isolamento).

Porém, a dinâmica de produção e secreção dessas proteínas (antígenos) não foi estabelecida, portanto um resultado negativo (em qualquer estágio da infecção) não deve ser usado como critério para descartar um caso, e, por isso, outros critérios devem ser levados em consideração.

## Testes rápidos de detecção de anticorpos/antígenos (TRDAs)

Até agora, não existem testes de diagnóstico rápido (imunocromatografia ou detecção com ouro coloidal) que tenham sido autorizados por autoridades regulatórias competentes e/ou que tenham sido formalmente validados. Em geral, esses tipos de testes apresentam baixa sensibilidade. Portanto, seu valor preditivo positivo é bom (podem ser usados para confirmar casos), mas seu valor preditivo negativo é baixo (não devem ser usados para descartar casos). Além disso, as limitações descritas acima para testes sorológicos e detecção antigênica aplicam-se a TRDAs.

## Algoritmo de teste

Deve-se considerar o teste para o vírus COVID-19 para pacientes que se encaixam na definição de caso (10). Os laboratórios devem continuar a usar o algoritmo de teste de *Influenza* recomendado pela OPAS para a vigilância de rotina do *Influenza* e de casos incomuns de infecções respiratórias agudas graves.

## Fortalecimento da capacidade e das redes dos laboratórios

Todos os laboratórios nacionais de saúde pública, inclusive os *National Influenza Centers* (NIC) [Centros Nacionais de Influenza], com capacidade de diagnóstico molecular, implementaram a detecção do vírus COVID-19. Os laboratórios são solicitados a garantir a disponibilidade de recursos humanos e materiais genéricos (ex.: kits de extração e enzimas RT-PCR) para a detecção do vírus COVID-19, e a se planejar para um grande aumento nos testes laboratoriais.

Além disso, as plataformas de sequenciamento podem ser usadas para a caracterização genética do vírus COVID-19 em laboratórios com capacidade de sequenciamento de próxima geração ou por Sanger. Esses laboratórios são estimulados a sequenciar, de maneira oportuna, amostras positivas e compartilhar as informações genéticas com a plataforma *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) [Iniciativa Global de Compartilhamento de Todos os Dados de Influenza]. A OPAS está trabalhando para estabelecer e fortalecer uma rede de sequenciamento do genoma do COVID-19 na região das Américas para disponibilizar os dados do genoma mais rapidamente.

Países que não possuam capacidade de diagnóstico molecular para implementar a detecção do vírus COVID-19 devem enviar amostras clínicas de casos suspeitos (que se encaixem estritamente na definição de caso) para um laboratório de referência. A lista de laboratórios de referência da OMS que fornecem testes de confirmação está disponível no seguinte endereço: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>

Na região das Américas, atualmente existem dois laboratórios de referência da OMS para o vírus COVID-19:

- Laboratório de Diagnóstico de Vírus Respiratórios, CDC, Atlanta, Estados Unidos.
- Laboratório de Vírus Respiratórios, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

A OPAS deve ser contatada antes que as amostras sejam encaminhadas para os laboratórios de referência da OMS.

Os países que não tenham capacidade de diagnóstico molecular para implementar a detecção do vírus COVID-19, mas que pretendam estabelecer tal capacidade, podem entrar em contato com a OPAS para obter orientação e suporte.

## Notificação de dados

De acordo com o Regulamento Sanitário Internacional (RSI), todos os casos confirmados de COVID-19 devem ser notificados em 24 horas através dos canais oficiais do RSI (10).

Além disso, é obrigatório notificar todos os resultados positivos e negativos para COVID-19 na base de dados FluNet que é enviada semanalmente à OPAS/OMS. As planilhas atualizadas da FluNet com a adição de uma nova coluna para a notificação de COVID-19 foram enviadas aos países para substituir a versão anterior. Mais informações podem ser obtidas através do e-mail [flu@paho.org](mailto:flu@paho.org).

## Referências

1. Azhar EI, Hui DSC, Memish ZA, Drosten C, Zumla A. The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(4):891-905.
2. Drosten C, Preiser W, Gunther S, Schmitz H, Doerr HW. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. *Trends Mol Med.* 2003;9(8):325-7.
3. Hui DSC, Zumla A. Severe Acute Respiratory Syndrome: Historical, Epidemiologic, and Clinical Features. *Infect Dis Clin North Am.* 2019;33(4):869-89.
4. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(8):523-34.
5. Hilgenfeld R, Peiris M. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res.* 2013;100(1):286-95.
6. Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAIID). Newly discovered betacoronavirus, Wuhan 2019-2020. 2020 [Disponível em: [platform.gisaid.org/epi3/frontend#414223](https://platform.gisaid.org/epi3/frontend#414223)].
7. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. *bioRxiv.* 2020:2020.02.07.937862.
8. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Geneva: WHO; 2020 [Disponível em: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)].
9. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. WHO/COVID-19/laboratory/2020.5. Geneva: WHO; 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.
10. World Health Organization. Global Surveillance for human infection with coronavirus disease (COVID- 2019), Interim guidance. WHO/2019-nCoV/SurveillanceGuidance/2020.6. Geneva: WHO; 2020. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/surveillance-and-case-definitions>.
11. Pan American Health Organization / World Health Organization. Requirements and technical specifications of personal protective equipment (PPE) for the novel coronavirus (2019-ncov) in healthcare settings, Interim recommendations. Washington, DC: PAHO / WHO; 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/requirements-and-technical-specifications-personal-protective-equipment-ppe-novel>.
12. Pan American Health Organization / World Health Organization. Interim laboratory biosafety guidelines for the handling and transport of samples

associated with the novel coronavirus 2019 (2019- nCoV). Washington, DC: PAHO / WHO; 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/interim-laboratory-biosafety-guidelines-handling-and-transport-samples-associated-novel>.

13. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19). WHO/WPE/GIH/2020.2. Geneva: WHO; 2020. Disponível em: [https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19)).
14. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel, Instructions for Use. Atlanta: CDC; 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Processing of Sputum Specimens for Nucleic Acid Extraction. Atlanta: CDC; 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/processing-sputum-specimens.pdf>.
16. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020;25(3).
17. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak – Emergency Use Listing Procedure (EUL) announcement. Geneva: CDC; 2020. Disponível em: [https://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/EUL/en/](https://www.who.int/diagnostics_laboratory/EUL/en/).
18. Centers for Disease Control and Prevention. CDC protocol of realtime RTPCR for swine influenza A(H1N1). Geneva: WHO; 2009. Disponível em: [https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol\\_20090428.pdf](https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtimeRTPCRprotocol_20090428.pdf).
19. Meyer B, Drosten C, Muller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. Virus Res. 2014;194:175-83.
20. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. medRxiv. 2020:2020.03.02.20030189.

© **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2020. Alguns direitos reservados.  
Este trabalho é disponibilizado sob licença CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Número de referência: OPAS/EOC/Covid-19/20-0003