

Artigo de atualização

Protocolos utilizados para diagnostico de COVID-19

Protocols used for COVID-19 diagnosis

Fabiana Cristina Belchior de Sousa¹; Leticia Cavalcante Nolêto Trajano Silva²; Marcos André Arrais de Sousa³; Marcos Aurélio Alves de Santana⁴; Rondenelly Brandão da Silva⁵

1. Veterinária. Doutorado em produção animal pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

2. Farmacêutica. Docente Faculdade de Ensino Superior de Floriano - FAESF. Mestranda em Biotecnologia em saúde animal e humana pela Universidade Estadual do Ceará. Coordenadora do curso de Farmácia da FAESF. (Contato: coordenacao_farmacia@faesfpi.com.br)

3. Farmacêutico. Docente Faculdade de Ensino Superior de Floriano - FAESF. Mestranda em Biotecnologia e atenção básica em saúde- FACID/ Wyden.

4. Farmacêutico. Docente Faculdade de Ensino Superior de Floriano - FAESF. Mestranda em Biotecnologia e atenção básica em saúde- FACID/ Wyden.

5. Químico. Docente Faculdade de Ensino Superior de Floriano - FAESF. Doutorado em Biotecnologia pelo programa RENORBIO.

Introdução

A doença COVID-19 foi descoberta em dezembro de 2019 na província Hubei, na China. A identificação foi feita pelo cultivo do vírus retirado amostra dos seios nasais. Em seguida, foi identificado como o agente responsável pela doença um novo tipo de coronavírus, o SARS-CoV-2. Pertencente à família Coronaviridae, esse vírus causa uma doença respiratória (UDUGAMA et al., 2020). A doença espalhou-se rapidamente pelo território chinês, e atingiu cinco países do continente. E em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 uma pandemia (BRASIL, 2020).

A doença pode ser transmitida de pessoa para pessoa por meio de pequenas gotículas do nariz ou da boca que se espalham quando uma pessoa com COVID-19 tosse ou espirra. Os principais sintomas são febre, fadiga e tosse seca e falta de ar. No entanto, segundo Guan et al. (2019) os pacientes de COVID-19 apresentam sintomas que estão associados a outras infecções respiratórias. Estes mesmos autores relatam que os sintomas expressos pelos pacientes são inespecíficos e não podem ser utilizados para um diagnóstico preciso. Dessa forma, uma vigilância minuciosa é necessária para monitorar todo seu ciclo e combater a disseminação do COVID-19 em todo o mundo.

Atualmente não existe nenhum tratamento específico ou vacina aprovadas pela Organização Mundial de Saúde, o diagnostico vem se tornando um papel importante na limitação do COVID-19, permitindo a rápida implementação de medidas de controle que limitam a propagação através da identificação, isolamento e rastreamento de contatos. Dessa forma, objetivou-se resumir as principais ferramentas de diagnóstico para detectar SARS-CoV-2.

As técnicas de diagnóstico laboratorial para identificação do vírus SARS-Cov-2, são essências para calcular as taxas precisas de infecção e sobrevivência dados importantes para acertar as medidas de segurança pública. No entanto, ainda não existe consenso entre os especialistas nas definições de caso e critérios clínicos para avaliação diagnóstica no COVID-

19, contudo, se faz necessária uma avaliação clínica e laboratorial (MARINELLI et al., 2020). Assim, os principais métodos de diagnósticos laboratorial que estão sendo utilizados para identificação do vírus SARS-Cov-2 (o coronavírus que causa a doença de COVID-19) são: PCR em Tempo Real (qPCR), e testes rápidos sorológicos validado pelas instituições de referência (BRASIL, 2020).

As técnicas moleculares são mais adequadas que os testes clínicos para diagnósticos precisos, pois podem direcionar e identificar patógenos específicos. O desenvolvimento de técnicas moleculares depende do entendimento, da composição proteômica e genômica do patógeno ou da indução de alterações na expressão de proteínas ou genes no hospedeiro durante e após a infecção (UBUGAMA et al., 2020). Os outros tipos de testes medem as respostas de anticorpos ao vírus no soro sanguíneo. Na Tabela 2 é possível observar as principais diferenças entre os métodos utilizados.

RT-qPCR em tempo real

A técnica da reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) foi descrita pela primeira vez em 1993, por HIGUCHI e seus colaboradores. Esta técnica tem como base o processo de transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) que permite amplificar ácidos nucleicos e quantificar o DNA obtido com a marcação de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas aos nucleotídeos dos *amplicons* sintetizados, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação (em “tempo real”) (BUSTIN, 2010).

A detecção do aumento do produto de qPCR ao longo de cada ciclo é possível em virtude de utilizar reagentes fluorescentes que possibilitam a detecção da formação do produto da PCR. Esses reagentes podem ser de dois tipos: uma sonda específica que reconhece sequências do genoma (*TaqMan*); ou um corante fluorescente que apresenta alta afinidade ao DNA dupla-fita, ligando-se a qualquer sequência amplificada (*SYBR Green*). Essa ligação reagente-*amplicon* faz com que aumente a fluorescência e permite detectar o produto da qPCR conforme este se acumula durante os ciclos da reação (HUGGETT et al., 2005).

A técnica de transcrição reversa seguida pela PCR em tempo real (RT-qPCR) é um dos métodos utilizado para detectar o SARS-CoV-2, o vírus que causa o COVID-19. Esta técnica, é considerado padrão ouro, sendo método de referência no Brasil no diagnóstico laboratorial do COVID-19. Outras características positivas da RT-qPCR são resultados de quantificação rápidos e alta acurácia (GREEN, et al., 2020). É um teste molecular que se baseia na detecção de sequências únicas de RNA viral, com confirmação por sequenciamento dos ácidos nucleicos, quando se faz necessário (BRASIL, 2020).

Testes sorológico

O teste sorológico são dispositivos simples que visam detectar anticorpo específico produzido pelo corpo humano contra o vírus SARS-CoV-2 ou detectar antígeno desse vírus. Isso é feito a partir da detecção de anticorpos IgM e IgG em pessoas que foram expostas ao

SARS-CoV-2. Nesse caso, o exame é realizado a partir da amostra de sangue do paciente. Para que o teste tenha maior sensibilidade, é recomendado que seja realizado, pelo menos, 10 dias após o início dos sintomas. Isso se deve ao fato de que produção de anticorpos no organismo só ocorre depois de um período mínimo após a exposição ao vírus. Assim, os métodos sorológicos são desenvolvidos para detecção de anticorpos IgG e IgM ou detecção de antígenos específicos do vírus (GREEN et al., 2020).

Testes rápidos

Os testes rápidos para COVID-19 são similares aos testes de farmácia para gravidez. No caso do teste para COVID-19, faz-se uso de uma lâmina de nitrocelulose (uma espécie de papel) que reage com a amostra e apresenta uma indicação visual em caso positivo. Estão disponíveis no mercado dois tipos de testes rápidos: de antígeno (que detectam proteínas do na fase de atividade da infecção) e os de anticorpos (que identificam uma resposta imunológica do corpo em relação ao vírus). A vantagem desses testes seria a obtenção de resultados rápidos para a decisão da conduta. No entanto, a maioria dos testes rápidos existentes possuem sensibilidade e especificidade muito reduzidas em comparação as outras metodologias. O Ministério da Saúde aponta que os testes rápidos não possui a mesma sensibilidade que os demais métodos, o que pode gerar insegurança e incerteza para interpretar um resultado e determinar se o paciente em questão precisa ou não manter em observação (BRASIL, 2020).

Em virtude de sucessivas revisões, o Ministério da Saúde destaca que, por causa da dinâmica da epidemia e a produção de conhecimento, essas informações podem sofrer alterações à medida que o conhecimento da doença avance. Assim, é importante que evidências mais recentes sejam utilizadas na atualização das versões deste protocolo. Ressaltando, ainda que futuras atualizações serão realizadas sempre que necessário, devendo o profissional de saúde estar atendo a isso.

Referências

- Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo de manejo clínico do coronavírus (COVID-19) na atenção primária à saúde. **Secretaria de Atenção Primária à Saúde (SAPS)**. 2020; 7:1-38. https://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/Abril/08/20200408_ProtocoloManejo-ver07.pdf
- Bustin SA. Why the need for qPCR publication guidelines. The case for MIQE. **Methods**. v. 50, n. 4, p. 217–226, 2010.
- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020. 10. 1056/NEJMoa2002032
- Green K, Winter A, Dickinson R, Graziadio Sara, Wolff R, Mallett S, Allen J. What tests could potentially be used for the screening, diagnosis and monitoring of COVID-19 and what are their advantages and disadvantages? **CEBM**. 2020; 4.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Real-time monitoring of DNA amplification reactions. **BioTechnology**. v. 11, p. 1026–1030, 1993.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, et al. A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v.6, p.279-284, 2005.

Marinelli NP, Albuquerque LPA, Sousa IDB. Protocolo de manejo clínico do COVID-19: por que tantas mudanças? **Revista Cuidarte**. 2020; 11(2): e1220.
<http://dx.doi.org/10.15649/cuidarte.1220>.

Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, Chen H, Mubareka S, Gubbay JB, Chan WC W. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. **ACS Nano**. 2020; 3 (0c02624): <https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>.

Tabela 1. Diferença entre os métodos

Formato	RT-qPCR	Sorológico	Teste rápido
Demanda	Média para alta	Baixa para média	Baixa
Analíto	RNA	Anticorpo (IgG ou IgM)	Anticorpo
Amostra	Swab de nasofaringe, aspirado de nasofaringe, ou labado broncoalveolar (LBA)	Sangue, soro ou plasma	Sangue, soro ou plasma
Amostra por dia	100-1000	10 -100	< 20
Tempo de resposta	45 min-4 hs	2 hs	< 30min
Tipo de uso	Infecção ativa	Infecção ativa (IgM) e pós (IgG)	Infecção ativa (IgM) e pós (IgG)
Sensibilidade	>98%	~ 85%	~ 85%
Especificidade	100%	> 94%	> 94%
Maior precisão	Desde o primeiro dia dos sintomas devido à alta sensibilidade	Apenas alguns dias após os primeiros sintomas, com chances de falso negativos durante o início da infecção devido à ausência de anticorpos	Durante a fase aguda da doença, com chances de falso negativos durante o início da infecção devido a baixa sensibilidade
Padrão ouro	Sim	Não	Não

Fonte: Thermo Fisher Scientific.