

COVID-19 - Diagnóstico Laboratorial para Clínicos


COVID-19 - Laboratory Diagnosis for Clinicians

Luisane Maria Falci Vieira^I, Eduardo Emery^{II}, Adagmar Andriolo^{III}

Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo (SP), Brazil

Authors indexing: Veira LMF, Emery E, Andriolo A

^IMD, Patologista Clínico, Presidente Regional da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/LM), Belo Horizonte (MG), Brasil; Diretora Técnica do Laboratório Lustosa, Belo Horizonte (MG), Brasil.

 <https://orcid.org/0000-0002-5037-6490>

E-mail: luisane@gmail.com

^{II}MD, MSc. Patologista Clínico, Coordenador do Comitê de Imunologia da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/LM), Belo Horizonte (MG), Brasil; Membro da Câmara Técnica de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial do Conselho Regional de Medicina do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

 <https://orcid.org/0000-0003-0935-8757>

E-mail: eduemery@bighost.com.br

^{III}MD, PhD. Patologista Clínico, Professor Associado e Livre Docente, Escola Paulista de Medicina — Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP), São Paulo (SP), Brasil. Chefe da Disciplina de Clínica Médica e Medicina Laboratorial da EPM-UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil. Editor do Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

 <https://orcid.org/0000-0002-7355-8684>

E-mail: adagmar.andriolo@gmail.com

Authors' contribution: Veira LMF: fez contribuições substanciais para a concepção do trabalho; aquisição, análise ou interpretação de dados; revisão crítica do conteúdo; aprovação final da versão a ser publicada; concorda em ser responsável por todos os aspectos do trabalho, garantindo que as questões relacionadas à precisão ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam investigadas e resolvidas adequadamente. Emery E: fez contribuições substanciais para a concepção do trabalho; aquisição, análise ou interpretação de dados; revisão crítica do conteúdo; aprovação final da versão a ser publicada; concorda em ser responsável por todos os aspectos do trabalho, garantindo que as questões relacionadas à precisão ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam investigadas e resolvidas adequadamente. Andriolo A: fez contribuições substanciais para a concepção do trabalho; aquisição, análise ou interpretação de dados; revisão crítica do conteúdo; aprovação final da versão a ser publicada; concorda em ser responsável por todos os aspectos do trabalho, garantindo que as questões relacionadas à precisão ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam investigadas e resolvidas adequadamente.

Sources of funding: None

Conflict of interest: None

Address for correspondence:

Adagmar Andriolo
Rua Botucatu 740, 2º andar — Sala COREME
Vila Clementino — São Paulo (SP) — Brasil
CEP 04023-900
Tel. (+55 11) 5575-9262
E-mail: a.andriolo@unifesp.br

KEY WORDS (MeSH terms):

Coronavirus; Clinical laboratory techniques; Pandemics; Molecular biology

AUTHORS' KEY WORDS:

Biological process; Laboratory diagnosis.; Viral infection.

RESUMO

COVID-19 (do inglês *coronavirus disease 2019*) é uma doença infecciosa causada pelo novo coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). *Coronaviridae* compreende uma grande família e, pelo menos, sete membros são conhecidos por causarem doenças respiratórias em humanos. Os coronavírus têm a capacidade de infectar, praticamente, todos os principais grupos de animais e, eventualmente, podem passar a contaminar humanos. O SARS-CoV-2 é o terceiro coronavírus a transpor a barreira entre espécies e infectar humanos. Esse vírus foi identificado em um surto de casos de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, em dezembro de 2019. Todo o seu genoma está inscrito em uma fita única de ácido ribonucleico. Algumas proteínas presentes na superfície do vírus atuam como facilitadores do seu ingresso nas células hospedeiras, outras, aparentemente, estão relacionadas com a sua patogenia. Os coronavírus são responsáveis por infecções respiratórias em seres humanos e em alguns animais. Frequentemente, a infecção é de intensidade leve a moderada, mas alguns coronavírus podem causar doenças graves, como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*), que ocorreu em 2002 e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês *Middle East respiratory syndrome*). Os coronavírus podem ativar uma

resposta imune excessiva e desregulada, a qual pode propiciar o desenvolvimento SRAG. Ainda que o pulmão seja um dos órgãos alvo, o mecanismo de hipóxia é sistêmico e outros órgão passam a sofrer tanto a falta de oxigênio quando a desregulação dos mecanismos de controle da inflamação.

ABSTRACT

COVID-19 (coronavirus disease 2019) is an infectious disease caused by the new coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome 2 (SARS-CoV-2). Coronaviridae comprises a large family and at least seven members are known to cause respiratory diseases in humans. Coronaviruses have the ability to infect virtually all major groups of animals and, eventually, can infect humans. SARS-CoV-2 is the third coronavirus to cross the species barrier and infect humans. This virus was identified in an outbreak of pneumonia in the city of Wuhan, Hubei province, China, in December 2019. Its entire genome is inscribed on a single ribbon of ribonucleic acid. Some proteins present on the surface of the virus act as facilitators of its entry into host cells, others, apparently, are related to its pathogenesis. Coronaviruses are responsible for respiratory infections in humans and some animals. The infection is often mild to moderate in intensity, but some coronaviruses can cause serious illnesses, such as Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) (SARS), which occurred in 2002 and the Middle East respiratory syndrome. (MERS, from Middle East respiratory syndrome). Coronaviruses can activate an excessive and unregulated immune response, which can promote SRAG development. Although the lung is one of the target organs, the hypoxia mechanism is systemic and other organs suffer both the lack of oxygen and the disruption of inflammation control mechanisms.

Introdução

COVID-19 (do inglês *coronavirus disease 2019*) é uma doença infecciosa causada pelo novo coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). *Coronaviridae* compreende uma grande família, sendo que pelo menos sete dentre os coronavírus são bastante conhecidos por causarem doenças respiratórias em humanos. Os coronavírus têm a capacidade de infectar praticamente todos os principais grupos de animais, sendo que alguns dos que hospedam outras espécies podem passar a contaminar humanos. O entendimento atual é que o SARS-CoV-2 é o terceiro coronavírus zoonótico a transpor a barreira entre espécies e se tornar capaz de infectar humanos, nas duas últimas décadas.

O coronavírus causador da COVID-19

O SARS-CoV-2 é um novo *betacoronavírus* pertencente à grande família viral dos *coronaviridae*, identificado pela primeira vez em um surto de casos de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, em dezembro de 2019. O nome COVID-19, foi escolhido para nomear essa nova infecção a partir do acrônimo de doença do coronavírus 2019, resultando em "co" de corona, "vi" de vírus, "d" de doença e o número 19 indicando o ano de sua aparição. Há um esforço da Organização Mundial da Saúde (OMS) para que a nomenclatura de vírus e suas infecções não se refira mais a localidades geográficas como tradicionalmente, de forma a combater o estigma decorrente dessa prática.

Todo o genoma do SARS-CoV-2 está inscrito em uma fita única de RNA (ácido ribonucleico). Esse tipo de vírus sofre mutações genéticas com maior frequência do que os vírus DNA (ácido desoxirribonucleico), por terem menor capacidade de correção dos eventuais erros de transcrição.¹ O SARS-CoV-2, em especial, é um vírus RNA de fita simples, com capacidade de sintetizar cerca de 29 diferentes proteínas. Algumas dessas proteínas estão presentes na superfície do vírus e atuam como facilitadores do seu ingresso nas células hospedeiras, outras, aparentemente, estão relacionadas com a sua patogenicidade.

Caracteristicamente, os coronavírus são responsáveis por infecções respiratórias em seres humanos e em alguns animais. Na maioria das vezes, a infecção causada pelos vírus dessa família é de intensidade leve a moderada, e se manifesta como um resfriado comum. Alguns coronavírus podem causar doenças mais graves, como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory*

Syndrome), que ocorreu em 2002 e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês *Middle East respiratory syndrome*), que ainda ocorre em uma região bem delimitada.

Os coronavírus podem ativar uma resposta imune excessiva e desregulada, nociva ao hospedeiro. Essas respostas podem contribuir para o desenvolvimento de SRAG. Autópsias de pacientes com COVID-19 complicada por SRAG revelaram hiperativação de células T efectoras (CD8+) com altas concentrações de grânulos citotóxicos. Relatos que descrevem o perfil imunológico de pacientes críticos com COVID-19 sugerem uma hiperativação da via imune celular como mediadora da insuficiência respiratória, do choque e da falência de múltiplos órgãos.

O SARS-CoV-2 liga-se à célula do hospedeiro humano por meio do receptor ACE2 (enzima conversora da angiotensina 2), e seu mecanismo de entrada depende da atuação sequencial da enzima serina protease TMPRSS2. Esses dados sugerem vários possíveis alvos terapêuticos, incluindo o eixo interleucina (IL)-6-STAT3, associado à síndrome de liberação de citocinas (CRS, do inglês *cytokine release syndrome*).

Outra proteína estrutural do vírus teria a habilidade de deslocar o ferro presente na hemoglobina, reduzindo a capacidade de transporte de oxigênio e proporcionando a baixa saturação observada em alguns dos pacientes que evoluem mal. Adicionalmente, a liberação de íons ferro em quantidades elevadas causaria danos oxidativo, desencadeando um processo inflamatório intenso que pode resultar na condição identificada como tempestade de citocinas. Ainda que o pulmão seja um dos órgãos alvo, o mecanismo de hipóxia é sistêmico e outros órgão passam a sofrer tanto a falta de oxigênio quando a desregulação dos mecanismos de controle da inflamação. Outros dois órgãos fortemente afetados são o fígado e os rins.

As manifestações clínicas de COVID-19 podem ser desde totalmente assintomáticas (em até 89% dos infectados) ou caracterizar-se por sintomas discretos até críticos e fatais. Os sintomas podem se desenvolver entre 2 a 14 dias após a exposição ao vírus,² com um período médio de incubação de 5,1 dias. Daí o período recomendado de quarentena ser, habitualmente, de 14 dias.

Ainda que os números possam variar nas diferentes populações afetadas, nos dados disponibilizados pelo Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças (CCDC), 81% dos pacientes tiveram manifestações clínicas discretas, 14% manifestações graves, incluindo hipóxia, 5% foram críticos, com insuficiência respiratória, disfunção multiorgânica e choque e 2,3% tiveram êxito fatal.³

O curso da doença pode girar desde cerca de 16 dias após um curto período de incubação em casos leves a moderados ou até 10 semanas, caso haja um período de incubação mais prolongado e desfecho grave ou fatal. Os cenários clínicos seguintes são estimados a partir de várias publicações.

- Período de incubação de 2 a 14 dias (média de 5 a 6 dias) após a infecção
- Casos leves – duas semanas
- Casos graves e recuperado – três a seis semanas

Uma pessoa pode ser transmissora mesmo antes de surgirem os sintomas até o desaparecimento deles, com pico cerca de cinco dias após o início dos sintomas. Nota: A pandemia é recente, as informações aqui disponibilizadas podem mudar.⁴

Diagnóstico laboratorial

Quando uma pessoa infectada elimina gotículas com vírions do SARS-CoV-2 e elas são inaladas por outra pessoa, encontra a mucosa nasal com células recobertas com receptores ACE2, aos quais o vírus se liga para penetrar e sequestrar o maquinário celular para produzir outros vírions e infectar novas células. Enquanto ocorre a multiplicação viral, a pessoa elimina vírions em grande quantidade, especialmente na primeira semana, período que pode ser assintomático ou paucissintomático, com febre, tosse seca, dor de garganta, anosmia, ageusia e fortes dores de cabeça ou pelo corpo.⁵ Caso o sistema imune não seja capaz de interromper a infecção nesse ponto, o vírus progride pelo trato respiratório até os alvéolos pulmonares, ricos em receptores ACE2. Nos alvéolos, ocorre a migração de leucócitos pela ação das citocinas, resultando em disrupção das trocas gasosas, com pneumonia, caracterizada por tosse produtiva, febre e dispneia.⁶

Em pacientes ambulatoriais com sintomas gripais, a disfunção quimiossensorial do olfato e do paladar está fortemente associada à infecção por SARS-CoV-2 e deve ser considerada sugestiva à triagem clínica. A maior parte dos acometidos recupera essa função dentro de semanas, em paralelo com a resolução dos outros sintomas.⁷

Nesse ponto, alguns pacientes deterioram abruptamente, desenvolvendo SRAG. A respiração se torna mais dificultada e os níveis de oxigenação despencam. Aos exames de radiografia simples e tomografia computadorizada do tórax vê-se a típica opacidade em vidro fosco. Necessitam de ventilação artificial e muitos morrem nesta fase da doença. Pacientes com quadro grave de COVID-19, frequentemente desenvolvem insuficiência respiratória aguda hipoxêmica e pneumonia, sendo que de 17% a 29% desses pacientes desenvolvem SRAG, contudo distinta em vários aspectos da SRAG habitual, na qual a

complacência pulmonar está diminuída. Nos pacientes com COVID-19 a complacência pulmonar é alta.

O vírus, provavelmente com o concurso da resposta imune a ele, pode causar danos a outros órgãos:

- Fígado: cerca de metade dos pacientes hospitalizados mostram sinais de alterações hepáticas.
- Rins: dano renal, inclusive com insuficiência renal e a necessidade de diálise é comum nos casos graves.
- Intestinos: pode haver uma apresentação clínica caracterizada por sintomas gastrintestinais, principalmente vômitos, diarreia e dor abdominal. Descreve-se uma dor “estomacal” que pode estar associada a uma inflamação da base dos pulmões e do diafragma. O trato gastrointestinal inferior é rico em receptores ACE2 e cerca de 20% dos pacientes referem diarreia.
- Sistema nervoso central: há relatos de acidentes vasculares, possivelmente às custas da formação de microtrombos, convulsões e alterações cognitivas.
- Olhos: nos casos graves, é descrita a ocorrência de conjuntivite.
- Coração: é descrito um aumento de eventos cardiovasculares, notadamente infarto agudo do miocárdio e eventos tromboembólicos e, até mesmo, coagulação intravascular disseminada.

Exames moleculares para sars-cov-2: reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (rRT-PCR)

A metodologia baseada na reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa com reação de amplificação em tempo real (RT-PCR em tempo real ou RT-qPCR) é a que melhor se aplica para a detecção do vírus SARS-CoV-2. Com essa técnica, é possível a identificação do RNA viral. Os genes considerados para a identificação incluem: N, E, S e RdRP e o protocolo internacional desenvolvido pelo Instituto Charité/Berlim⁸ e recomendado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) tem sido utilizado pela maioria dos países. Inicialmente, a confirmação laboratorial dependia da detecção de dois marcadores genéticos, mas considerando a elevada taxa de circulação do vírus, atualmente, a confirmação pode ser pela detecção de um único marcador genético. O Ministério da Saúde brasileiro recomenda que o gene alvo seja o gene E, pela sua maior sensibilidade.⁸

A recomendação para confirmação laboratorial dos casos é a detecção de dois marcadores genéticos diferentes (por exemplo: gene E seguido pelo gene RdRP, conforme descrito anteriormente para o protocolo de Charité). Uma vez que a circulação do vírus seja estabelecida e disseminada em uma determinada área ou país, não seria mais necessário executar a PCR para ambos os genes e a confirmação pode ser implementada pela detecção de um único marcador genético. O gene E possui sensibilidade um pouco maior que o gene RdRP, por isso o Ministério da Saúde sugere priorizar o gene E como marcador de escolha.⁸

Para melhorar a capacidade de resposta da rede pública, poderão ser disponibilizados no Brasil testes rápidos moleculares para processamento em plataforma automatizada, GeneXpert (Cepheid), a mesma utilizada na Rede de Teste Rápido da Tuberculose. O teste realiza detecção qualitativa *in vitro* de ácido nucleico do SARS-CoV-2, por PCR em tempo real, automatizado, tendo como alvos os genes E e N2, em amostras de suabe nasofaríngeo ou aspirado/lavado nasal de indivíduos suspeitos da COVID-19.⁸

O genoma do SARS-CoV-2 foi rapidamente sequenciado, apresentando 80% de similaridade com o coronavírus SARS-CoV e 50% com MERS-CoV. O diagnóstico laboratorial molecular da COVID-19, em sua fase inicial, pode ser feito a partir de material coletado do trato respiratório superior (nasofaringe ou orofaringe) ou do trato respiratório inferior (escarro, aspirado traqueal ou lavado broncoalveolar) e se baseia na detecção de ácido nucleico viral específico. Como o SARS-CoV-2 é um vírus RNA, para sua identificação é necessário gerar uma fita de DNA complementar (cDNA), o que é obtido pela ação da enzima transcriptase reversa. Após a transcrição reversa, são inseridos dois primers, que promovem a amplificação de dois alvos genéticos. Com uma sonda complementar, é possível observar o conteúdo molecular correspondente ao do agente infeccioso alvo.

No momento, há barreiras importantes para o uso generalizado da RT-PCR para o novo coronavírus. Destaca-se o quantitativo insuficiente de testes e equipamentos disponíveis no país, além de ser essa uma metodologia laboriosa quando a extração e a realização do teste são manuais, ocasionando grande número de exames pendentes de realização, principalmente, mas não exclusivamente, na rede pública dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs). Existe uma tendência de normalização desse cenário à medida em que há grande estímulo para a produção desse teste.

Esse exame laboratorial é bastante específico, contudo sua sensibilidade pode variar, principalmente em função de variáveis pré-analíticas como:

Fase da infecção e carga viral nas secreções e excreções, principalmente amostras de trato respiratório superior coletadas com menos de 3 e mais de 10 dias desde o início da contaminação;

Local da coleta, sabe-se que os materiais do trato respiratório inferior (escarro, lavado broncoalveolar) tendem a apresentar maior positividade do que aqueles do trato respiratório superior (suabe combinado de naso e orofaringe);

Técnica de coleta, transporte e armazenamento da amostra até a sua análise, para evitar a degradação do RNA contido no espécime.

Esse exame detecta diretamente a presença de componentes específicos do genoma do vírus. Por isso, ele deve ser utilizado para diagnóstico da doença nas fases assintomática, pré-sintomática ou sintomática, nos 12 primeiros dias desde o início dos sintomas. Ainda não existem dados na literatura brasileira suficientes para que se tenha exata noção quanto à sensibilidade e especificidade dessa metodologia no país. Apenas como referência, podem ser descritas as seguintes taxas de sensibilidade (resultados verdadeiramente positivos na presença da doença): 93% para pesquisa no lavado broncoalveolar, 72% no escarro, 63% no material nasal e 32% no de orofaringe. É possível a detecção do vírus também em sangue, fezes, urina e saliva, mas essas amostras ainda não estão desenvolvidas para diagnóstico de rotina e muitos dos estudos de detecção do vírus foram realizados apenas por meio de sua visualização por microscopia eletrônica e técnica de neutralização viral.

Reputa-se a RT-PCR para o diagnóstico de SAR-CoV-2 como altamente específica, e o resultado positivo confirma a infecção (“padrão ouro”). Contudo, devido aos citados problemas quanto à sensibilidade, o resultado negativo não a afasta e pode ser necessária a repetição do exame em outra amostra após alguns dias.

Com a finalidade de garantir a realização do exame que está sendo requisitado, é fundamental que a solicitação médica seja clara e objetiva. É recomendado que o médico solicitante indique o material a ser coletado (por exemplo: secreção de orofaringe, de nasofaringe, de escarro, aspirado traqueal ou lavado broncoalveolar) e explicito o exame a ser realizado: RT-PCR para SARS-CoV-2.

Painéis moleculares para outros vírus respiratórios

Segundo a orientação do Ministério da Saúde,⁸ pacientes com SRAG que apresentem teste molecular para COVID-19 negativo, devem realizar a pesquisa para outros vírus respiratórios, inclusive o de influenza.

Os vírus respiratórios são os patógenos mais frequentemente associados às infecções respiratórias agudas (IRA), com elevada morbimortalidade em crianças no primeiro ano de vida, em adultos imunodeprimidos e em idosos. A pneumonia é a causa mais comum dos desfechos fatais. O esclarecimento da causa viral evita a administração indevida de antimicrobianos e permite a identificação do vírus causal, facilitando o estudo de surtos.

Para essa finalidade, podem ser coletadas amostras de secreções do trato respiratório para serem submetidas a exames de diagnóstico molecular para a detecção de ácidos nucleicos específicos de diversos vírus respiratórios. Esses painéis moleculares multiplexados são conhecidos popularmente como “viomas”. A sua abrangência pode variar entre os laboratórios, mas, em geral, há capacidade de detecção de influenza, parainfluenza, coronavírus, vírus sincicial respiratório, adenovírus, metapneumovírus, enterovírus, bocavírus e rinovírus.

Um estudo chinês relatou que a coinfeção com outros vírus respiratórios seria rara.⁹ Outro estudo sobre a incidência de coinfeção mostra que a detecção molecular de outro patógeno que não SARS-CoV-2 não é suficiente para assegurar a ausência de infecção pelo novo coronavírus. Esses resultados não apoiam a realização rotineira de viroma, devido à sua baixa efetividade nesse contexto, sendo uma possível exceção é a possibilidade de uso de inibidores de neuraminidase em pacientes infectados, ou coinfectados, por influenza.¹⁰

Como coinfeções virais são relativamente frequentes, segundo o Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil,¹¹ todos os pacientes suspeitos de síndrome gripal (SG) ou SRAG devem ser testados para o vírus da COVID-19 e para outros patógenos respiratórios usando procedimentos laboratoriais habituais.

Exames laboratoriais imunológicos

Considerando-se a orientação da OMS quanto à necessidade de testagem em massa das populações, a expansão da pandemia e as barreiras atuais à realização de RT-PCR compatível com a demanda, as empresas produtoras de reagentes diagnósticos

laboratoriais passaram a desenvolver testes para pesquisa de anticorpos e antígenos relacionados ao vírus. A vasta literatura já existente ressalta que os coronavírus são agentes infecciosos imunogênicos, capazes de gerar respostas imunológicas humorais e celulares no hospedeiro.

Como todas as demais infecções virais, o organismo reage à presença do vírus produzindo anticorpos, inicialmente os das classes imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina M (IgM) e, na sequência, os da classe imunoglobulina (IgG). A presença de anticorpos específicos contra determinantes antigênicos do SARS-CoV-2 indica que houve infecção pregressa, mas considerando ser um agente infeccioso que muito recentemente foi introduzido na comunidade, não pode ser afastada a ocorrência de reações cruzadas com outros coronavírus em circulação comunitária, o que pode comprometer a especificidade dos testes.

Para a produção desses anticorpos, há necessidade de algum tempo, que em média é de 7 a 10 dias após o início dos sintomas para os anticorpos da classe IgM e de 10 dias, ou mais, para os IgG. Evidentemente, esses números indicam o início da possível detecção dos anticorpos e são limítrofes. Com o passar dos dias a sua concentração vai se elevando e diminui a chance de resultados falso negativos. Enquanto a pesquisa de partículas virais é realizada principalmente nas secreções e lavados, a pesquisa e quantificação de anticorpos pode ser feita em sangue capilar, sangue total, soro ou plasma, exigindo, portanto, a coleta de sangue, ou da ponta do dedo, para o teste rápido ou de uma veia, para a obtenção de sangue total.

Vários testes imunológicos já estão disponibilizados no mercado, chancelados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para pesquisa de anticorpos IgA, IgM e IgG e antígeno viral. Diversas metodologias são oferecidas:

Metodologias automatizadas: (ELISA [do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*], quimioluminescência e eletroquimioluminescência) - a pesquisa e quantificação de anticorpos é realizada no sangue total, soro ou plasma, realizada em ambiente laboratorial, em equipamentos analíticos capazes de quantificar os níveis de anticorpos e a realização de exames em amostras pareadas, distanciadas de 28 dias. Em geral, mais sensíveis e específicas e pouco dependentes do executante.

Metodologias para “testes rápidos”, mais adequadamente denominados “**testes laboratoriais remotos**” (TLR) (POCT, do inglês *point of care testing*): (imunocromatografia, principalmente) – a pesquisa de anticorpos em sangue total, soro ou plasma por meio de métodos manuais, os quais são realizados de forma rápida em

dispositivos individuais, fornecendo resultados em tempos que variam de 10 a 30 minutos. No momento, há relatos de deficiências de desempenho atribuídas a alguns testes desse tipo, os quais estão em processo de avaliação e validação por laboratórios clínicos, tanto públicos como privados.

Há alguns testes rápidos disponíveis para a pesquisa de antígeno viral em material colhido nas narinas e garganta, ainda pouco estudados quanto à sua efetividade em relação aos exames moleculares.

As diferentes qualidades quanto ao desempenho dos Testes Rápidos atualmente disponibilizados se deve a vários aspectos técnicos, como diferentes processos de purificação dos antígenos virais do coronavírus (S e N) sem perda de seu formato tridimensional para o adequado reconhecimento pelos anticorpos (ou seja, qualidade dos antígenos), grau ideal de sensibilização de superfícies, qualidade dos reativos, estocagem, transporte, entre outros.

A literatura relacionada à produção de anticorpos (anticorpo gênese) frente a um estímulo antigênico, evidencia ser esta uma resposta individual. Logo, a quantidade de anticorpos formados poderá variar e ocasionar diferentes momentos de detecção destes anticorpos, embora a grande maioria dos trabalhos em infecções por coronavírus assinalam que, por volta do sétimo e oitavo dias, eles já sejam evidenciados, ressaltando, então, que alguns pacientes poderão levar tempo menor ou maior. Conclui-se que devemos estar atentos à uma possível variabilidade da janela imunológica (espaço compreendido entre a contaminação e a detecção laboratorial dos anticorpos)

Ainda não é possível afirmar, com segurança, se os anticorpos formados se constituem em defesa efetiva contra uma possível reinfecção, ou seja, se conferem imunidade e, caso positivo, qual a sua duração. Ainda não é possível afirmar, com clareza, o papel dos testes rápidos sorológicos para o diagnóstico individual, uma vez que o resultado não reativo não afasta a possibilidade de infecção por SARS-CoV-2. Por outro lado, resultados reativos podem levar a uma falsa sensação de segurança para reexposição ao vírus. Contudo, no contexto da saúde pública, para uso em inquéritos sorológicos populacionais, pode estar a sua maior utilidade.

No começo de abril, a OMS recomendou que os testes rápidos fossem realizados apenas para fins epidemiológicos e contraindicou a sua utilização para o diagnóstico. Nos casos em que os testes RT-PCR são não reativos, mas permanece suspeita de infecção por COVID-19, testes sorológicos realizados em amostras sequenciais podem auxiliar no esclarecimento diagnóstico.¹²

Atestado de soropositividade

No momento atual, a melhor definição para “passaporte de imunidade”, seria, talvez, “atestado de soropositividade”. Há uma forte pressão para que a vida social retorne ao antigo padrão “normal”, ou seja, que haja um afrouxamento do distanciamento social. Com o recente desenvolvimento de exames laboratoriais que detectam a presença de anticorpos, foi criada a expectativa de que pessoas nas quais sejam detectados anticorpos contra SARS-CoV-2, potencialmente, poderiam ser liberados para suas atividades habituais. Estudos nesse sentido estão sendo realizados em alguns países da comunidade europeia, especialmente a Alemanha, China e Estados Unidos. No momento, os seguintes elementos precisam ser considerados:

- Os anticorpos começam a ser detectados uma a duas semanas após a infecção;
- Ainda não se sabe se os anticorpos detectáveis pelos exames atuais são capazes de conferir imunidade duradoura (ou seja, se seriam anticorpos protetores) e por quanto tempo.
- Os novos testes foram liberados de forma acelerada e ainda precisam ser cuidadosamente validados;

No caso da SARS de 2002, os anticorpos se mostraram presentes por dois a três anos e no caso da MERS, por um ano. No caso da COVID-19, essa informação seria importante para determinar, por exemplo, o intervalo de retestagem para atestar a imunidade de forma continuada e programas de vacinação.

Não se tem certeza de que o surgimento de anticorpos indique que a pessoa não é mais transmissora ou de que torne imune, e por quanto tempo. Já se demonstrou que algumas pessoas são carreadoras do vírus por um tempo prolongado (algumas semanas).

Há questões éticas. Mesmo que o percentual de falso reativos não seja grande, pessoas não imunes seriam consideradas imunes e expostas e pessoas suscetíveis poderiam ser discriminadas pelo mercado de trabalho. E por último, há que evitar que ocorra comércio desse tipo de certificado, inclusive por meio de fraude.

Avaliação laboratorial da tempestade inflamatória

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular liberadas por vários tipos de células, principalmente as que compõem o sistema imunológico, com a finalidade de sinalização intercelular. As citocinas liberadas pelas células do sistema imunológico, entre várias ações, atuam no sentido de modular a resposta inflamatória a partir do momento em que

o organismo é agredido por agentes infecciosos. O termo "citocina" é derivado de duas palavras gregas "cito" para célula e "kinos" para movimento. O racional para essa nomenclatura, que reforça seu caráter móvel, se baseia no fato de, por serem moléculas pequenas, possuem grande mobilidade nos fluidos corporais e têm a habilidade de recrutar diferentes células do sistema imune para atuarem em conjunto.

A resposta inflamatória é um evento extremamente complexo, envolvendo numerosos agentes celulares e humorais, que tem, entre outras, a finalidade de identificar, isolar, neutralizar e eliminar agentes nocivos ao organismo. Ela envolve a participação de elementos celulares e humorais que atuam coordenadamente, automodulando a intensidade de resposta frente a um agente invasor. Algumas vezes, porém, pode ocorrer uma desregulação da resposta inflamatória, quando são liberadas quantidades excessivas de citocinas, as quais ativam e recrutam células do sistema imune, gerando uma resposta superdimensionada, resultando em hiperinflamação. Essa condição é denominada "tempestade de citocinas" e resulta na geração de um microambiente nocivo ao próprio organismo.

O conceito de tempestade de citocinas aparentemente começou a ser estudado no começo da década de 90. Associada a várias infecções virais, foi reconhecida em 2002 como um fator de alto risco à vida, durante o surto da SRAG. O termo foi cunhado apenas em 2005, quando da gripe aviária causada pelo vírus H5N1, tendo sido relacionada a elevada taxa de mortalidade à uma resposta pró-inflamatória exacerbada. Em algumas doenças não infecciosas, como a esclerose múltipla, também pode ser observada a tempestade de citocinas. Desde então, a tempestade de citocinas foi descrita em várias doenças respiratórias causadas por vírus da família dos coronavírus, como a MERS em 2012 e, mais recentemente, pelo SARS-CoV-2.¹³ A principal causa de morte da COVID-19 é a insuficiência respiratória causada pela SRAG.¹⁴

Outra síndrome relacionada à resposta imune é a linfo-histiocitose hemofagocítica secundária (sHLH, do inglês *secondary haemophagocytic lymphohistiocytosis*), condição ainda pouco conhecida, caracterizada por hipercitocinemia fulminante e que evolui rapidamente para insuficiência de múltiplos órgãos. É descrita em cerca de 3,7% a 4,3% dos casos de sepse,¹⁵ mas é mais frequentemente descrita em infecções virais.¹⁶ Clinicamente, ela se caracteriza pela presença de febre constante, citopenias e elevado nível de ferritina, das interleucinas (IL), do fator estimulador de colônias de granulócitos (GCSF, do inglês *granulocyte-colony stimulating factor*), de interferon- γ proteína induzível 10 (*interferon- γ inducible protein 10*) de proteína quimioatraente 1 de

monócitos, (*monocyte chemoattractant protein 1*), de proteína inflamatória de macrófagos 1- α (*macrophage inflammatory protein 1- α*) e do fator de necrose tumoral- α (*tumour necrosis factor- α*).¹⁷

A SRAG ocorre em cerca de 50% dos pacientes com sHLH.^{18, 19} Ao serem comparados grupos de pacientes com a SRAG associada ao novo coronavírus, os resultados laboratoriais mostram diferenças significativas entre sobreviventes e não sobreviventes. Os parâmetros diferenciais mais marcantes incluem as contagens de leucócitos, os valores absolutos de linfócitos e de plaquetas, a concentração de albumina, bilirrubina total, ureia, creatinina, mioglobina, troponina cardíaca, proteína C reativa (PCR) e interleucina-6 (IL-6) séricas.

Em pacientes com COVID-19, os níveis de ferritina e de IL-6 se mostraram serem bons preditores de fatalidade, como mostrado na **Tabela 1**, adaptada do trabalho de Ruan e colaboradores,¹⁴ reforçando a hipótese da presença de um estado de hiper-reação inflamatória.

Outros parâmetros laboratoriais

COVID-19 é uma infecção sistêmica com impacto significativo sobre o sistema hematopoiético e a hemostasia. A linfopenia pode ser considerada um sinal laboratorial cardinal, com potencial prognóstico. As razões neutrófilo/linfócito e plaquetas/linfócitos no pico podem ajudar a avaliar a gravidade dos casos. No curso da doença, a avaliação longitudinal da dinâmica das contagens de linfócitos e dos índices inflamatórios (incluindo desidrogenase láctica, PCR e IL-6) podem contribuir para identificar casos com pior prognóstico e indicar intervenções mais agressivas. Outros biomarcadores, como a procalcitonina e a ferritina também estão sendo considerados fatores que indicam pior prognóstico.

A hipercoagulabilidade é frequente em pacientes hospitalizados por COVID-19. Níveis elevados de dímero-D têm sido reportados de maneira consistente, destacando-se a elevação progressiva de seus níveis com indicação de piora do quadro. Outras anormalidades de exames da coagulação, como prolongamento dos tempos de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e elevação de produtos de degradação da fibrina e trombocitopenia grave indicam a possibilidade de coagulação intravascular disseminada (CIVD), a qual deve ser monitorada e deve sofrer intervenção precocemente.

Pacientes com COVID-19, tanto hospitalizados como ambulatoriais, apresentam risco elevado de tromboembolismo venoso e sendo recomendada a tromboprolifaxia farmacológica precoce e prolongada com heparina de baixo peso molecular.¹⁸

Outros parâmetros laboratoriais relevantes incluem a linfopenia, elevação do TP, de dímero-D e da atividade da desidrogenase láctica, observados já na fase inicial de resposta à presença do vírus. Com a instalação de pneumonia e consequente hipóxia, elevam-se as transaminases, indicando sofrimento hepatocelular significativo. A elevação das atividades das enzimas hepáticas é um indicador importante de gravidade do quadro. Ao se atingir o estágio mais grave, de hiperinflamação, acompanhada de coagulopatia, os marcadores de inflamação como PCR, ferritina, troponina e peptídeo natriurético cerebral (BNP, do inglês *brain natriuretic peptide*) estarão muito elevados, caracterizando a tempestade inflamatória.

REFERÊNCIAS

1. Knipe DM, Roizman B, Straus SE et al. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. ISBN-13: 978-0-7817-1832-5
2. Centers of Disease Control Prevention (CDC). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Symptoms of Coronavirus. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>. Acessado em 2020 (29 abr).
3. Yan CH, Faraji F, Prajapati DP, Boone CE, DeConde AS. Association of chemosensory dysfunction and Covid-19 in patients presenting with influenza-like symptoms. Int Forum Allergy Rhinol. 2020. PMID: 32279441; doi: [10.1002/alr.22579](https://doi.org/10.1002/alr.22579). [Epub ahead of print]
4. Britt RR. From Infection to Recovery: How Long It Lasts. Covid-19's duration varies widely depending on severity, but now we know the rough range. Medium, 13 de abril de 2020. Disponível em: <https://elemental.medium.com/from-infection-to-recovery-how-long-it-lasts-199e266fd018>. Acessado em 2020 (29 abr).
5. Ferguson NM, Laydon D, Nedjati-Gilani G, et al. Impact of non-pharmaceutical interventions (NPIs) to reduce COVID-19 mortality and healthcare demand. Imperial College COVID-19 Response Team. doi: [10.25561/77482](https://doi.org/10.25561/77482).

6. Gorbalenya AE. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses — a statement of the Coronavirus Study Group. doi: [10.1101/2020.02.07.937862](https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862).
7. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. JAMA. 2020. PMID: 32091533; doi: [10.1001/jama.2020.2648](https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648). [Epub ahead of print]
8. Ministério da Saúde. Boletim COE COVID-19. Centro de Operações de Emergência em Saúde Pública/Doença pelo coronavírus 2019, Boletim Epidemiológico 12 – COE COVID-19 – 19 de abril de 2020. Available from: <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/Abril/19/BE12-Boletim-do-COE.pdf>. Accessed in 2020 (Apr 29).
9. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. Lancet. 2020;395(10223):507-13. PMID: 32007143; doi: [10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).
10. Kim D, Quinn J, Pinsky B, Shah NH, Brown I. Rates of Co-infection Between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. JAMA. 2020. PMID: 32293646; doi: [10.1001/jama.2020.6266](https://doi.org/10.1001/jama.2020.6266) [Epub ahead of print]
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil [recurso eletrônico]/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde; 2016. Available from: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_laboratorial_influenza_vigilancia_influenza_brasil.pdf. Accessed in 2020 (May 7).
12. RCPA advises against COVID-19 IgG/IgM rapid tests for the detection of early COVID disease. Media Release, 1 april 2020. Available from: <https://www.rcpa.edu.au/getattachment/6a74686a-e558-4efa-bc6c->

[a9921b7837df/RCPA-advises-against-COVID-19-IgG-IgM-rapid-tests-f.aspx](https://doi.org/10.1181/a9921b7837df/RCPA-advises-against-COVID-19-IgG-IgM-rapid-tests-f.aspx). Accessed in 2020 (Apr 29).

13. Wang Q, Fang P, He R, et al. O-GlcNAc transferase promotes influenza A virus–induced cytokine storm by targeting interferon regulatory factor–5. *Science Advances*. 2020;6(16):eaaz7086. Available from: <https://advances.sciencemag.org/content/6/16/eaaz7086.full>. Accessed in 2020 (May 7).

14. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med*. 2020. PMID: 32125452; doi: [10.1007/s00134-020-06028-z](https://doi.org/10.1007/s00134-020-06028-z). [Epub ahead of print]

15. Carter J, Saunders V. *Virology: Principles and Applications*. Chichester: Wiley; 2007. ISBN: [978-0-470-02386-0](https://doi.org/10.1002/9780470023860)

16. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, López-Guillermo A, Khamashta MA, Bosch X. Adult haemophagocytic syndrome. *Lancet*. 2014;383(9927):1503-16. PMID: 24290661; doi: [10.1016/S0140-6736\(13\)61048-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61048-X).

17. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506. PMID: 31986264; doi: [10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).

18. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol*. 2020. PMID: 32282949; doi: [10.1002/ajh.25829](https://doi.org/10.1002/ajh.25829). [Epub ahead of print]

19. Seguin A, Galicier L, Boutboul D, Lemiale V, Azoulay E. Pulmonary involvement in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Chest*. 2016;149(5):1294-301. PMID: 26836913; doi: [10.1016/j.chest.2015.11.004](https://doi.org/10.1016/j.chest.2015.11.004).

Tabela 1. Parâmetros laboratoriais em pacientes com COVID-19, modificada de Rual e colaboradores¹⁴

Parâmetros laboratoriais	Intervalo de referência	Não sobreviventes Média (DP)	Sobreviventes Média (DP)	Valor de P
Tempo entre início dos sintomas e a coleta, em dias		11,6 (6,8)	9,8 (4,3)	0,07
Leucócitos, × 10 ⁹ /L	3,50-9,50	10,62 (4,76)	6,76 (3,49)	< 0,001
Linfócitos, × 10 ⁹ /L	1,10-3,20	0,60 (0,32)	1,42 (2,14)	< 0,001
Hemoglobina, g/L	130,0-175,0	127,0 (16,7)	127,6 (16,3)	0,82
Plaquetas, × 10 ⁹ /L	125,0-350,0	173,6 (67,7)	222,1 (78,0)	< 0,001
Albumina sérica, mg/dL	3,50-5,20	2,88 (0,38)	3,27 (0,38)	< 0,001
Alanina aminotransferase sérica, U/L	9,0-50,0	170,8 (991,6)	48,68 (83,1)	0,35
Aspartato aminotransferase sérica, U/L	15,0-40,0	288,9 (1875,5)	40,7 (57,8)	0,31
Bilirrubina total sérica, mg/dL	0,3-1,5	1,1 (0,63)	0,75 (0,40)	0,001
Creatinina sérica, mg/dL	0,50-1,50	1,03 (0,64)	0,81 (0,27)	0,02
Creatina quinase sérica, U/L	50,0-310,0	319,4 (838,5)	231,7 (862,3)	0,56
Desidrogenase láctica sérica, U/L	120,0-250,0	905,8 (2619,1)	297,9 (110,4)	0,08
Troponina cardíaca sérica, pg/mL	2,0-28,0	30,3 (151,0)	3,5 (6,2)	< 0,001
Mioglobina sérica, ng/mL	0,0-146,9	258,9 (307,6)	77,7 (136,1)	< 0,001
Proteína C reativa sérica, mg/L	0,0-5,0	126,6 (106,3)	34,1 (54,5)	< 0,001
Interleukin-6 sérica, pg/mL	0,0-7,0	11,4 (8,5)	6,8 (3,61)	< 0,001
Ferritina sérica, ng/mL	21,8-274,7	1297,6 (1030,9)	614,0 (752,2)	< 0,001

DP = desvio padrão.