

ORGANIZAÇÃO DO SERVIÇO DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO SARS-COV2: A EXPERIÊNCIA DO PROGRAMA DE VIGILÂNCIA DA COVID-19 NA UFPA

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.909122430105>

Data de aceite: 11/11/2024

Dwane Louise de Castro Miranda

Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos

Cláudio Guedes Salgado

José Ricardo dos Santos Vieira

RESUMO: INTRODUÇÃO: A Covid 19 é causada pelo retrovírus SARS-Cov-19 cujos principais sintomas bem como achados laboratoriais são comuns a outras viroses respiratória. O diagnóstico definitivo baseia-se na identificação do RNA viral ou antígenos em amostras de secreção respiratória e saliva. A identificação de anticorpos no sangue apresenta padrão peculiar que não garante o diagnóstico da doença ativa. Em março de 2020, a UFPA criou o Programa de Vigilância da Covid-19 na UFPA para atender aos trabalhadores da instituição no momento crítico da pandemia em que não havia padrões bem definidos para a organização do fluxo de atendimento para o diagnóstico molecular da Covid-19. **OBJETIVO:** Propor um esquema de organização do serviço de diagnóstico laboratorial de SARS-CoV-2 por RT-qPCR

em amostra de saliva no laboratório de análises clínicas e no laboratório de genética humana e médica do ICB/ UFPA. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram atendidos 1.313 trabalhadores da UFPA, dos quais 1.153 realizaram a pesquisa de RNA viral pelo método de RT-qPCR, 710 realizaram a pesquisa de IgG no soro e 586 realizaram ambos os testes. O fluxo de atendimento foi sendo organizado de acordo com a demanda do serviço no esforço conjunto dos profissionais envolvidos no projeto. A Ouvidoria da UFPA realizou enquete com usuários do serviço estimando o grau de satisfação dos indivíduos atendidos. **RESULTADOS:** 98 (8,5%) dos sujeitos foram positivos nos testes de RT-qPCR e 161(22,7%) foram positivos para IgG. Foram identificados 35 (3,04%) resultados de RT-qPCR inconclusivos e 54 (7,6%) IgG indeterminados. As análises de correlação, OddsRatio e Risco Relativo, revelaram que há a chance 3,5 vezes aumentadas de indivíduos RT-qPCR positivos apresentarem também IgG positivo ($p < 0,0001$), o que indica que o IgG não deva ser específico do quadro crônico da doença ou que esses pacientes já tenham tido entrado em contato com o vírus e permanecido com o título detectável no momento da coleta. O

serviço foi avaliado com nota 9,02; o seu grau de importância foi classificado com nota 9,55; a satisfação com o atendimento ficou com nota 7,84 e nenhum usuário encontrou dificuldades em acessar o serviço. **CONCLUSÃO:** A realização do RT-qPCR nas amostras de saliva mostrou-se prática e ágil, Os resultados mostraram que a dosagem do IgG não é exclusiva dos casos crônicos. O serviço foi muito bem avaliado pelos usuários o que demonstra que a experiência do programa de vigilância da Covid-19 na UFPA foi bem-sucedida em sua proposição e execução.

PALAVRAS-CHAVE: Covid-19; SARS-Cov-2; RT-qPCR; diagnóstico.

ORGANIZATION OF THE SARS-COV2 LABORATORY DIAGNOSIS SERVICE: THE EXPERIENCE OF THE COVID-19 SURVEILLANCE PROGRAM AT UFPA

ABSTRACT: INTRODUCTION: Covid 19 is caused by SARS-Cov-19 retrovirus whose main symptoms as well as laboratory findings are common to other respiratory viruses. Definitive diagnosis is based on viral RNA or antigens identification in respiratory secretions and saliva samples. Antibodies identification in blood presents a peculiar pattern that does not guarantee active disease diagnosis. In March 2020, UFPA created the Covid-19 Surveillance Program at UFPA to assist workers at the critical moment of the pandemic when there were no well-defined standards for the flow of care for molecular diagnosis of Covid-19. **AIMS:** To propose an organization scheme for the SARS-CoV-2 laboratory diagnosis service using RT-qPCR in saliva samples in the clinical analysis laboratory and in the human and medical genetics laboratory at ICB/UFPA. **MATERIAL AND METHODS:** 1,313 asymptomatic workers at UFPA were attended, of which 1,153 performed the viral RNA test using the RT-qPCR method, 710 performed the serum IgG test and 586 performed both tests. Service flow was being organized according to the service demand by professionals involved in the project. UFPA Ombudsman carried out a survey with 50 users of the service, estimating the degree of satisfaction. **RESULTS:** 98 (8.5%) subjects were positive in RT-qPCR tests and 161 (22.7%) were positive for IgG. We identified 35 (3.04%) inconclusive RT-qPCR results and 54 (7.6%) indeterminate IgG results. Correlation analysis, Odds Ratio and Relative Risk, revealed that there is a 3.5 times greater chance of RT-qPCR positive individuals also presenting positive IgG ($p < 0.0001$), which indicates IgG should not be specific for chronic condition of disease or these patients have already come into contact with virus and remained with a detectable titer at time of sample collect. The service was rated 9.02; its degree of importance was rated 9.55; satisfaction with the service reached a score of 7.84 and no user found it difficult to access the service. **CONCLUSION:** RT-qPCR performed on saliva samples were a practical and agile method. Results have shown IgG measurement is not exclusive to chronic cases. The service was very well evaluated by users, demonstrating the experience of the Covid-19 surveillance program at UFPA was successful in its proposal and execution.

KEYWORDS: Covid-19; SARS-Cov-2; RT-qPCR; diagnosis.

INTRODUÇÃO

A Covid 19 é causada por um retrovírus descoberto em Whuan, cidade da China, em dezembro de 2019. Desde lá, o coronavírus SARS-CoV-2 teve grande visibilidade por meio da descoberta deste novo vírus capaz de causar grave pneumonia. O surto da doença causada pelo novo coronavírus, a Covid-19, foi considerado como emergência de saúde pública internacional, sendo ela considerada uma pandemia em março de 2020 (OPAS, 2020).

O coronavírus é um vírus de RNA e, dentre sete cepas capazes de causar patologias em humanos, três deles são responsáveis por surtos de pneumonia neste século: SARS-CoV-2 (Covid-19), MERS CoV (causa síndrome respiratória do Oriente Médio) e SARS-CoV: que causa síndrome respiratória aguda grave. Em relação ao genoma, codificam 16 proteínas não estruturais e 4 proteínas estruturais: glicoproteína de envelope (E), proteína de membrana (M), proteína de nucleocapsídeo (N) e glicoproteína de superfície “Spike” (MAGALHÃES, S., 2020).

Segundo Guo *et al.*, os coronavírus contêm um número variável de quadros de leitura aberta (ORF's). Na primeira ORF, dois terços do RNA viral traduzem duas poliproteínas (pp1a e pp1ab) e codificam 16 proteínas não estruturais (NSP), enquanto as ORFs restantes codificam proteínas acessórias e estruturais. Segundo Li, C. *et al.*, o genoma de SARS-CoV-2 tem profundas semelhanças genômicas com material genético de morcego, podendo indicar o mesmo antepassado por meio de 96,2% de sequências genômicas iguais. Outros estudos mostram que pangolins podem ser considerados como hospedeiros intermediários do coronavírus (WU, Di *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 trata-se de um betacoronavírus, da família *Coronaviridae* cujo genoma está contido em uma única fita de RNA de sentido positivo capaz de sofrer sucessivas mutações. O SARS-Cov-2 também é capaz de sintetizar mais de 20 proteínas diferentes, sendo algumas destas proteínas de superfície responsáveis pela infecção na célula hospedeira, bem como outras relacionadas com o mecanismo de patologia da Covid-19 (VIEIRA, L. M. F. *et al.*, 2020). Embora a patogênese viral seja desconhecida, estudos apontam que SARS-Cov-2 usa enzima conversora de angiotensina II como receptor de entrada para infecção na célula hospedeira. SARS-CoV-2 utiliza o mesmo mecanismo e, acredita-se que a transmissão para humanos foi propiciada pela mutação na glicoproteína de superfície (S) e no nucleocapsídeo (N) (SEO, G. *et al.*, 2020). Essa mutação na proteína S permitiu a entrada do vírus na célula pela fusão de membrana e receptor de ligação celular. Já a proteína N regula o procedimento de replicação do vírus juntamente com a transcrição e montagem. Juntas essas duas mutações conferem a distinção do SARS-CoV-2 em relação à cepa original, o que contribui para sua maior infectividade em seres humanos (LIPPI, G.; PLEBANNI, M., 2020). Os primeiros casos de Covid-19 foram associados a um mercado de frutos do mar em Whuan e a transmissão passada de animal

para humano. Sabe-se que os indivíduos assintomáticos (jovens e crianças) têm um papel fundamental na propagação da doença (já que são considerados suscetíveis). A emissão de partículas virais entre os indivíduos está relacionada ao trato respiratório superior e sua carga viral. Ou seja, a transmissão ocorre com a tosse, espirro e emissão de partículas de saliva e posterior contato com as mucosas e pode ser facilitada por meio de fômites como celulares e objetos compartilhados, além de contato pessoal por apertos de mão e abraços (XAVIER, R. A. *et al.*, 2020).

Segundo o Ministério da Saúde, os sintomas do coronavírus são coriza, tosse, febre, dor de garganta, dificuldade respiratória, perda de sensibilidade olfativa, paladar alterado, distúrbios gastrointestinais, falta de apetite, cansaço e dispneia. Dias *et al.*, (2020). Os achados laboratoriais incluem linfopenia, leucopenia e trombocitopenia leve. Também são encontrados o aumento de marcadores inflamatórios: lactato desidrogenase (LDH), proteína C reativa (PCR), aspartatoaminotransferase (AST), troponina, creatinoquinase (CK), ferritina e tempo de protrombina estendida (OLIVEIRA, A. B. *et al.*, 2020). Relata-se síndrome de ativação macrófágica (MAS) ou tempestade de citocinas, que é a resposta inflamatória em decorrência da Covid-19. Marcadores inflamatórios e ferritina estão elevados nestes casos, resultando em ativação endotelial de células pulmonares, infiltração por macrófagos e neutrófilos, terminando em injúria, hipóxia e inflamação tromboembólica (DIAS, H.C.M.V. *et al.*, 2020).

Além dos achados laboratoriais, exames complementares incluem a radiografia do tórax e a tomografia computadorizada, entretanto, segundo Guo *et al.*, (2020), a sensibilidade da radiologia é limitada e deve ser combinada com o diagnóstico clínico e detecção de RNA viral. Teichet *et al.*, em um dos primeiros estudos realizados no Brasil, no hospital israelita Albert Einstein, demonstraram que 93,6% das tomografias realizadas em seus estudos apresentaram resultados anormais, demonstrando o comprometimento pulmonar dos pacientes com Covid-19. Entre as anormalidades achadas estavam a opacidade em vidro fosco e consolidações bilaterais irregulares. O potencial pandêmico da Covid-19 pode ser controlado através de vigilância epidemiológica baseada em informações sobre a transmissibilidade, infecciosidade e evolução viral, bem como sua adaptação ao hospedeiro (MARINELLI, P.N. *et al.*, 2020). Neste sentido, o laboratório exerce grande importância no diagnóstico diferencial entre síndromes respiratórias e Covid-19, sendo o local para a detecção de amostras de triagem e diagnóstico confirmatório de SARS-CoV-2. Sendo assim, baseado na prática usual de abordagem laboratorial do diagnóstico de viroses respiratórias, as pessoas com suspeita de coronavírus faziam primeiramente o teste rápido IgG/IgM para detecção de anticorpos, visualizada por meio de cromatografia (através da punção digital) e, a seguir, a depender dos resultados dos testes, suas amostras poderiam ser encaminhadas para posterior diagnóstico confirmatório pelo teste molecular da RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction* - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase), por meio de *swab* da nasofaringe e orofaringe ou coleta de saliva.

JUSTIFICATIVA

O estudo do diagnóstico laboratorial da Covid-19 é de fundamental importância para a vigilância epidemiológica da população com o intuito de esclarecimentos a respeito de um vírus pouco conhecido no início de realização deste estudo, em março de 2020. Nesse sentido, os trabalhadores da UFPA que por razões da essencialidade de suas atividades, mantiveram-se em atividades presenciais, na linha de frente da pandemia, mereciam total atenção, já que eram os profissionais mais expostos ao novo coronavírus. Desta forma, a Universidade Federal do Pará (UFPA) criou o Programa de Vigilância da Covid-19 na UFPA que objetivava a oferta de diagnóstico laboratorial do SARS-Cov-2 por meio de RT-qPCR a trabalhadores (servidores docentes e técnicos administrativos, terceirizados e estagiários) da UFPA como forma de prevenção contra a Covid-19 e a melhoria das condições de trabalho. Assim, os trabalhadores dos hospitais universitários Bettina Ferro de Souza (HUBFS) e João de Barros Barreto (HUJBB), bem como demais trabalhadores em atividades presenciais da UFPA, tiveram apoio dos Laboratórios de Genética Humana e Médica (LGHM), do Laboratório de Análises Clínicas da (LAC), do laboratório didático de Biotecnologia e do Laboratório de Imunodermatologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA (ICB/UFPA) em relação ao diagnóstico da Covid-19.

A atenção aos trabalhadores em atividade presencial permitiu traçar medidas de prevenção e controle da doença na rotina diária da UFPA. De maneira adicional, o LGHM e o LAC contribuíram junto ao Laboratório Central do estado do Pará (LACEN) e à Secretaria de Estado de Saúde Pública (SESPA) e da Secretaria Municipal de Saúde de Belém (SESMA) melhorando a vigilância epidemiológica de casos de coronavírus no município de Belém.

A análise dos resultados deste programa e a avaliação do serviço prestado ajudaram a melhor organizar o fluxo de atividades de diagnóstico laboratorial da Covid-19 realizado pelos laboratórios do ICB/UFPA.

OBJETIVOS

Geral

- Estabelecer uma organização do serviço de diagnóstico laboratorial de SARS-CoV-2 por RT-qPCR em trabalhadores da UFPA por meio do Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM) e do Laboratório de Análise Clínicas (LAC) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Específicos

- Fazer a comparação sorológico-molecular das amostras de material coletado destes profissionais.
- Estabelecer uma análise laboratorial dos testes de diagnóstico nos profissionais da UFPA.
- Descrever o processo de organização do serviço de diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 no LGHM e LAC-ICB/UFPA.

COLETA DE MATERIAL

As coletas foram realizadas no local de trabalho por profissionais habilitados e estas foram devidamente acondicionadas até sua chegada ao LGHM e LAC para posterior etapa analítica das amostras. Em uma segunda etapa do projeto, as amostras passaram a ser coletadas no LAC e as amostras processadas no Laboratório didático de Biotecnologia e analisadas no LGHM.

A etapa analítica consistiu na extração de material genético e PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) como teste confirmatório, realizado na saliva seguindo protocolo proposto pelo laboratório

As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C para processamento em até 48 horas ou armazenadas a -70°C para posterior análise. O transporte até o Laboratório de Genética Humana e Médica foi feito com as amostras em refrigeração de 2-8 °C a partir das diretrizes do Ministério da saúde para coleta e conservação de amostras para Covid-19 (Brasil, 2020).

EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL DO SARS-COV-2

O RNA viral foi extraído por método automatizado: Maxwell® 16 (Promega) de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes. As cabines de segurança 2 (NB2) foram utilizadas para manipulação das amostras biológicas no laboratório didático de Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas.

A primeira etapa da extração de ácidos nucleicos consistiu na separação de alíquotas das amostras, por meio de através de 250 µL de saliva em dois microtubos do tipo *ependorfs*, sendo um deles para análise pelo equipamento Maxwell. Na segunda etapa houve a adição de 200 µL de tampão de lise, cujo objetivo é a ruptura da célula (lise celular) para que o conteúdo ficasse exposto. Neste caso, houve ruptura por método químico através de detergentes químicos. Os detergentes têm por função a destruição de lipídeos de membrana, através de desconstrução das ligações hidrofóbicas dos lipídios das membranas. Como a reação precisou ser feita com agentes quelantes, estes capturam íons, que por sua vez são usados como cofatores em proteínas que degradam ácidos nucleicos, a exemplo da DNase que precisa de íons magnésio. A seguir foi utilizada a proteinase K

(degrada proteínas) para purificação das moléculas que se deseja obter, separando-as dos demais componentes da célula contidas no *ependorf*. A terceira etapa foi a agitação das amostras em equipamento tipo *vortex*. A quarta etapa da reação foi a fixação das amostras no termobloco (56°C).

Houve ainda a adição de 50µL de nuclease *freewater* a cada *ependorf* com as amostras, antes da entrada no extrator automático. Seguindo-se à purificação, a etapa final da extração dos ácidos nucleicos (neste caso RNA) foi a precipitação destes com o uso de isopropanol para precipitação de RNA (Figura 1).

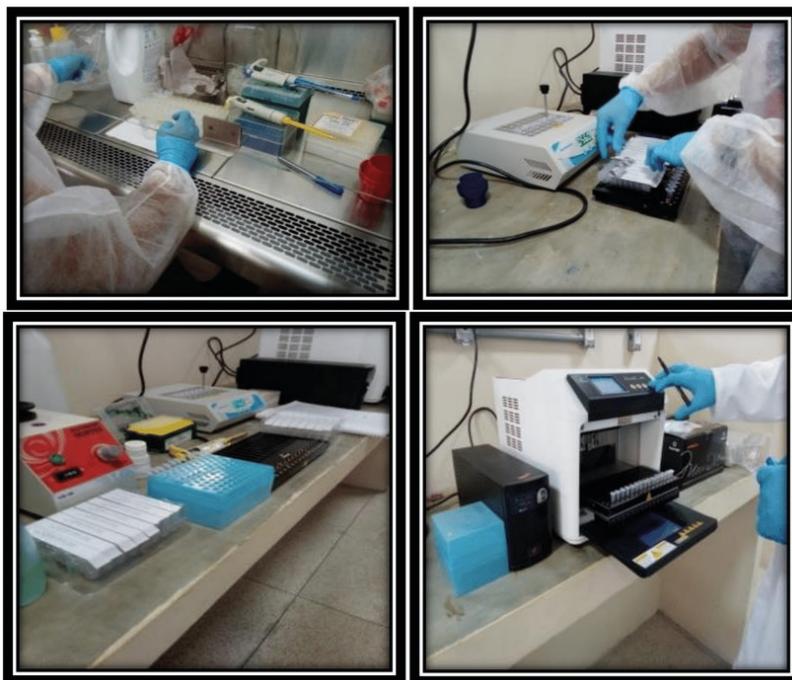


Figura 1 - Extração de RNA viral de SARS-Cov-2.

Fonte: fotos da autora.

REAL-TIME QUANTITATIVE REVERSE POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-qPCR)

O teste de RT-qPCR é considerado padrão-ouro na detecção de SARS-Cov-2. Segundo o Ministério da saúde, amostras da nasofaringe ou saliva coletadas até o 8º dia de sintomas, ou em qualquer momento para assintomáticos, é a amostra ideal para detecção viral por RT-qPCR.

As amostras de saliva deste estudo foram analisadas em equipamento ABI 7500 (Figura 2), com *primers* e sondas descritos por fabricante e protocolo ajustado pela equipe técnica do laboratório do LGHM.



Figura 2 - RT-qPCR (Equipamento ABI 7500)

Fonte: fotos da autora.

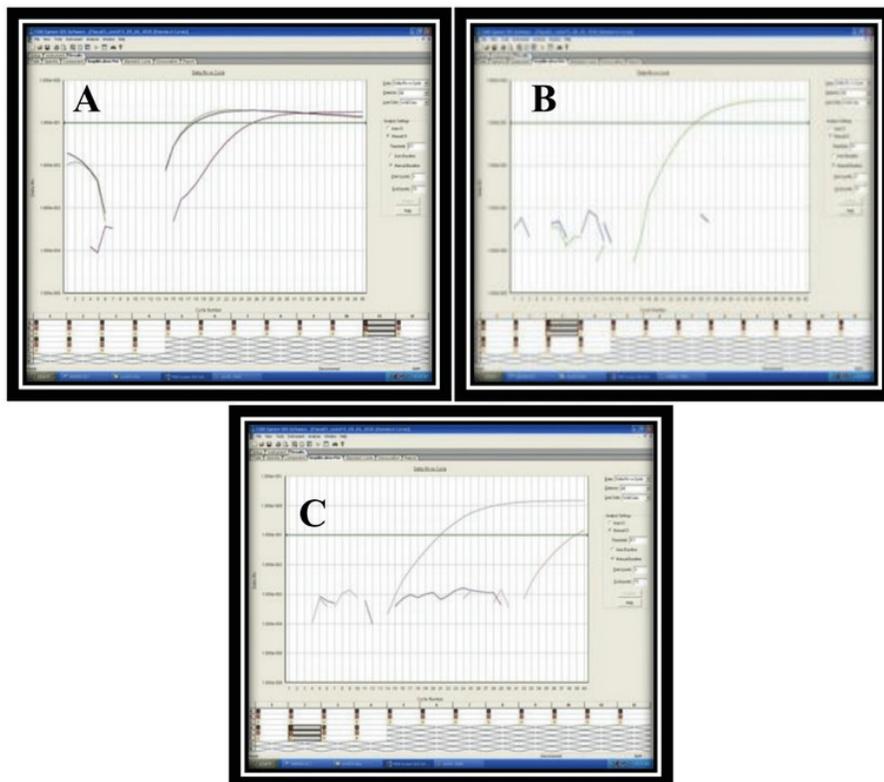


Figura 4 - Resultados de RT-qPCR para SARS CoV-2. A, B e C: resultados positivos, negativos e inconclusivos, respectivamente.

Fonte: fotos da autora.

O diagnóstico Padrão-Ouro para SARS CoV-2 (RT-qPCR) é baseado em uma técnica de biologia molecular capaz de detectar mínimas quantidades de antígenos na amostra laboratorial. Há um limite de detecção (Também chamado *Cut Off* (CT)- inglês ou ponto de corte, do português). Quando a linha de amplificação ultrapassa o CT (17 ou 18), o teste molecular é considerado positivo (Figura 4A), ou seja, o RNA do SARS CoV-2 foi detectado pelo equipamento. Um resultado negativo não atinge o CT do teste e significa que o RNA do vírus foi indetectável naquele momento, mas não indica ausência de doença. Também pode indicar um RNA em baixa titulação ou não detectável no limite do teste (Figura 4B). Já um resultado inconclusivo (Figura 4C) indica que o RNA viral apresentou divergência no teste molecular, como uma linha de amplificação acima do CT e outra abaixo do CT, indicando tecnicamente uma falha de detecção que precisa ser solucionada coletando outra amostra do paciente.

Dosagem de IgG

A dosagem de anticorpos IgG foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações com a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento de H_2O_2 em H_2O e O_2 . As análises foram realizadas no Laboratório de Imuno-dermatologia do ICB a partir de protocolo estabelecido pelo laboratório (FABRI et al., 2015). As amostras de sangue total foram separadas por centrifugação e o soro armazenado a $-20^\circ C$ até o momento da dosagem. A padronização para a dosagem de IgM não foi estabelecida a tempo de ser incluída na análise deste estudo.

Os resultados foram avaliados na base do índice ELISA (EI), que corresponde à densidade óptica (DO) da amostra dividida pela DO do ponto de corte (*cut-off*) que, por sua vez, foi calculado como uma média de três controles negativos (soros armazenados a $-80^\circ C$ e testados RT-qPCR negativos, oriundos de coletas em 2019, antes do surgimento da pandemia) mais três vezes o desvio padrão, de modo que amostras com valores de EI de 1,1 ou acima foram consideradas positivas. A dosagens com EI de 1,0 foram consideradas inconclusivas e as menores ou iguais a 0,9 foram negativas.

Critérios para o Diagnóstico clínico-epidemiológico-laboratorial

Ao final das análises, os resultados considerados RT-qPCR positivos foram comunicados aos pacientes e inseridos no sistema nacional de comunicação compulsória da Covid-19, bem como os pacientes encaminhados para atendimento no sistema de saúde (Anexo I). O retorno às atividades laborais dependia do tempo da dispensa médica e não do teste do paciente.

As dosagens de IgG somente foram realizadas após a emissão do resultado do RT-qPCR e não possuíam, portanto, finalidade diagnóstica. Desta forma, os resultados da sorologia foram entregues aos pacientes e a interpretação discutida, individualmente, pelos coordenadores do programa, quando solicitadas

Avaliação do serviço ofertado aos trabalhadores da UFPA.

A Ouvidoria da UFPA realizou enquete, por meio de um questionário *on-line*, com cinco questões para avaliar o grau de satisfação dos usuários (Apêndice 3). Os resultados foram expressos em gráficos e tabelas e serviram de base para a elaboração de relatório em atenção à determinação da Ouvidora Geral da União, por meio da Portaria N° 581, de 9 de março de 2021/CGU, que todas as unidades federais de prestação de serviço deveriam iniciar a avaliação dos mesmos por meio de suas ouvidorias.

RESULTADOS

Análises dos exames realizados

No período de 01/04/2020 a 15/12/2020, foram atendidos 1.313 trabalhadores da UFPA, dos quais 1.153 (87,8%) realizaram a pesquisa de RNA viral pelo método de RT-qPCR, 710 realizaram a dosagem de IgG no soro (54,1%) e 586 (44,6%) realizaram ambos os testes. A razão de nem todos os indivíduos terem realizados ambos os testes se deve ao fato de somente a partir de junho passou-se a fazer a dosagem de anticorpos. A dosagem da IgM não chegou a ser realizada porque não foi padronizada a tempo de ser implantada para este estudo. Alguns indivíduos atendidos no laboratório realizaram a pesquisa de IgG e IgM por meio de teste rápido cromatográfico, mas este teste não foi inserido na rotina do laboratório o que deixou de fora da análise neste estudo. Desta forma, somente o serviço de diagnóstico por meio do RT-qPCR foi avaliado. A dosagem de IgG, apesar de não constituir em método de diagnóstico de doença ativa, foi analisada neste estudo por conta dos resultados importantes observados na análise conjunta com a dosagem de RT-qPCR, que ajudaram a orientar as condutas do serviço.

Na amostragem total, 1.153 pacientes realizaram testes de RT-qPCR com 98 (8,50%) foram positivos, 1020 (88,46%) negativos e 35 (3,04%) inconclusivos; e 710 realizaram pesquisa de IgG com 161 positivos (22,7%), 495 (69,7%) negativos e 54 (7,6%) indeterminados (Figuras 5 e 6).

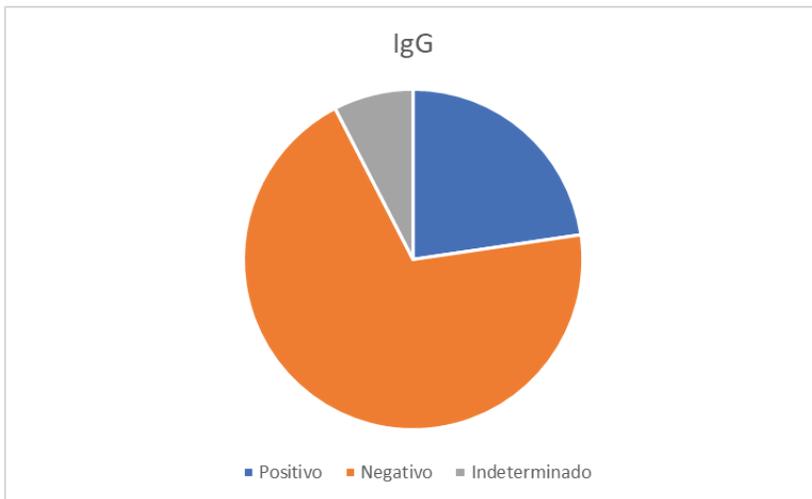


Figura 5 – Pesquisa de IgG no soro de indivíduos da pesquisa.

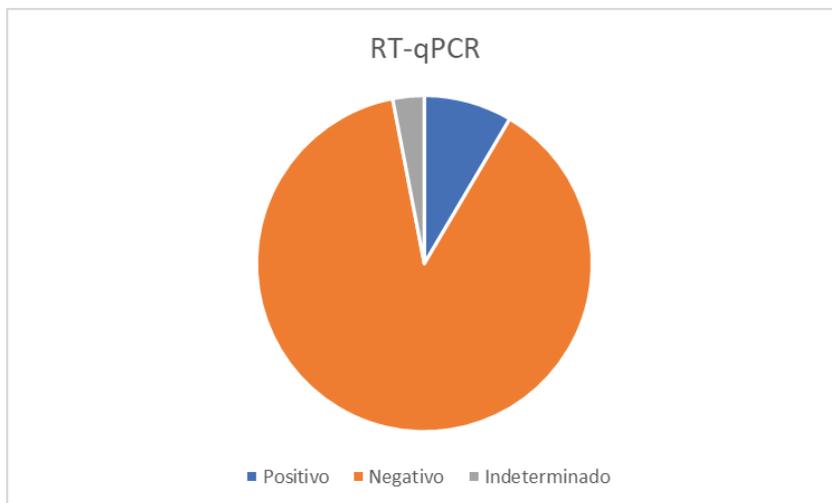


Figura 6 – Teste de RT-qPCR em participantes da pesquisa.

Somente 586 amostras tinham realizado os testes em conjunto, das quais, 129 (22,01%) eram positivas para IgG, 407 (69,45%) eram negativos e 50 (8,54%) foram indeterminados.

Em relação à RT-qPCR, das 586 amostras, 36 (6,14%) eram positivas, 530 (90,44%) eram negativas e 20 (3,41%) foram inconclusivas (Tabela 1).

Teste	Positivos (N / %)	Negativos (N / %)	Indeterminados (N / %)
IgG	129 (22,01)	407 (69,45)	50 (8,54)
RT-qPCR	36 (6,14)	530 (90,44)	20 (3,41)

Tabela 1– Distribuição das frequências absolutas da dosagem de IgG e pesquisa de RT-qPCR.

Em relação à média dos EI, dos 586 indivíduos que realizaram também o RT-qPCR, a média aritmética estava com 1,42 ($\pm 0,40$) para os positivos, de 0,64 ($\pm 0,15$) entre os negativos e de 0,94 ($\pm 0,03$) entre os indeterminados. A análise ANOVA e o Teste-T revelam que os valores das médias dos testes positivos e negativos variaram de maneira significativa em relação aos inconclusivos ($p < 0,0001$), mostrando que o EI referente ao laudo positivo ou negativo estava significativamente diferenciado dos indeterminados ou seja, os valores de referência adotados são suficientes para distinguir os resultados positivos e negativos (Tabela 2).

Para realizar as análises de correlação, *OddsRatio* (OR) e Risco Relativo (RR), foi analisado o risco para pacientes com RT-qPCR positivos apresentarem também IgG positivos, observando-se que 16 foram positivos para ambos os testes, 17 positivos somente para RT-qPCR, 102 negativos para RT-qPCR e positivos para IgG e 383 negativos para ambos os testes (Figura 7). Ficou demonstrado que pacientes RT-qPCR positivos apresentaram a chance 3,5 vezes aumentadas de serem IgG positivos (Tabela 3). Os dados foram agrupados em tabela de contingência 2x2 para a realização da análise de regressão logística condicional por OR e RR(Tabela 3).

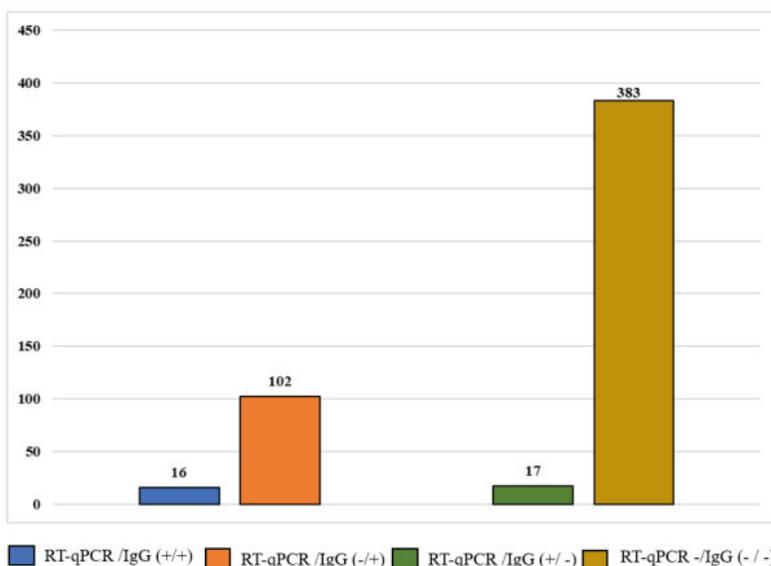


Figura 7 - Distribuição dos resultados de RT-qPCR positivos e negativos em relação aos resultados da pesquisa de IgG positivas e negativas.

	Positivos	Negativos	Inconclusivos
Média aritmética	1,42	0,64	0,94
Desvio padrão	$\pm 0,40$	$\pm 0,15$	$\pm 0,03$
ANOVA	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	-
Teste T (Student)*	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	-

Tabela 2 -Média dos Índice ELISA das amostras do estudo.

* Com correção de Tukey.

		IgG		OR (<i>p</i>)	IC (95%)	RR (<i>p</i>)	IC (95%)
		Positivo	Negativo				
RT-qPCR	Positivo	16	17	3,53	1,73 –	3,53	2,88 –
	Negativo	102	383	(<0,0001)	7,24	(<0,0001)	4,34

Tabela 3- Análise de correlação entre os resultados de testes positivos e negativos de RT-qPCR e IgG.

Análise do fluxo dos exames

Os testes moleculares de RT-qPCR foram considerados como suficientes para o diagnóstico laboratorial da Covid-19. Os testes sorológicos não foram incluídos na rotina de diagnóstico da doença, uma vez que a dosagem de IgM não foi padronizada a tempo para a inclusão neste estudo e o IgG, usualmente, é considerado no diagnóstico de doença crônica (LIU et al., 2020). De maneira adicional, os resultados reforçaram os achados de Bichara et. al (2020) ao demonstrar que resultados IgG positivos foi identificados de maneira significativa juntamente aos resultados de RT-qPCR positivos o que sugere que seu uso não pode ser indicador exclusivo de doença crônica, o que pode ser um fator de confusão na análise diagnóstica.

O uso da saliva como material biológico mostrou-se apropriado e o índice de inconclusivos parece não estar relacionado ao método em especial, pois resultados semelhantes foram identificados em outros trabalhos (YANG et. al, 2021; Kjellberg et al., 2021; ENGELBRECHT e SCHOLLES, 2021). A análise dos resultados de RT-qPCR contribuíram para estabelecer a organização do serviço de diagnóstico laboratorial dos profissionais em atividades presenciais, já que foi a primeira vez que este serviço foi ofertado na UFPA. Os resultados dos testes laboratoriais obedeceram a um fluxograma construído para compor um perfil genético epidemiológico destes indivíduos.

Enquete de avaliação do serviço

A Ouvidoria da UFPA recebeu 38 respostas ao formulário disponível para resposta voluntária à enquete sobre a qualidade do serviço ofertado no diagnóstico da Covid-19. Dessas respostas, 30 referiam-se a usuários do serviço e os resultados mostraram, que todos os respondentes pertenciam ao *campus* de Belém obtendo nota média de 9,02 e 25 usuários (65,8%) deram nota 10 ao serviço (Figura 8). O grau de importância do serviço obteve nota média 9,55, respondidas por 10 dos avaliados em 31 avaliações (81,6%) (Figura 9).

A satisfação com o atendimento obteve nota média de 7,84, com a nota 10 atribuída por 21 usuários (55,3%) e nota 9 em 8 avaliações (23,7%) (Figura 10). Nenhum usuário encontrou dificuldades em acessar o serviço (Figura 11).

Em uma escala de 1 a 10, como você avalia esse Serviço?

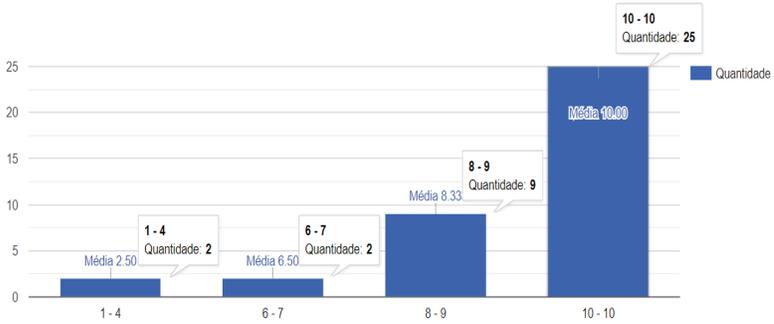


Figura 8 – Nota geral atribuída ao serviço. (Fonte: Ouvidoria da UFPA).

Em uma escala de 1 a 10, como você avalia o grau de importância desse Serviço?

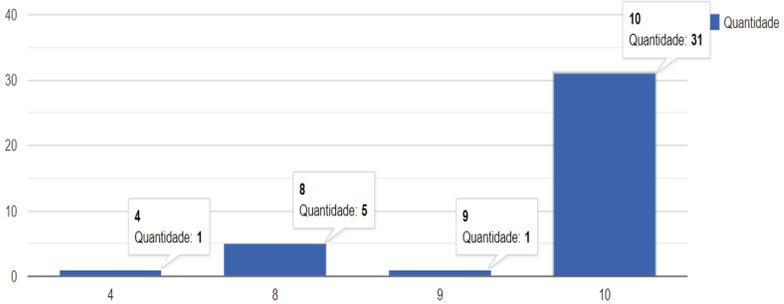


Figura 9 – Avaliação do grau de importância do serviço. (Fonte: Ouvidoria da UFPA).

Em uma escala de 1 a 10, quão satisfeito você ficou com o atendimento do Serviço?

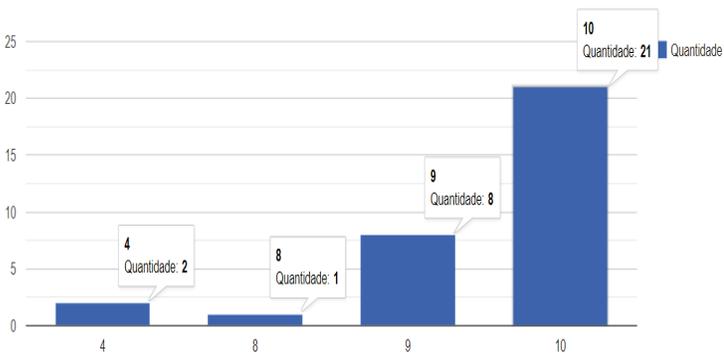


Figura 10 – Grau de satisfação do serviço.

Fonte: Ouvidoria UFPA.

Você encontrou dificuldade para ter acesso ao Serviço? Sim ou Não? Se sim, qual(is)? Caso não tenha utilizado o serviço, responda: Não utilizei o Serviço.

Não utilizei
Não encontrei nenhuma dificuldade.
Não
Não encontrei dificuldade para ter acesso ao serviço.
Não encontrei dificuldade para ter acesso ao Serviço.
Não utilizei o Serviço.
Não utilizei o Serviço
não utilizei o serviço
não utilizei
NÃO.

Você encontrou dificuldade para ter acesso ao Serviço? Sim ou Não? Se sim, qual(is)? Caso não tenha utilizado o serviço, responda: Não utilizei o Serviço.

Não utilizei o Serviço
não utilizei o serviço
não utilizei
NÃO.
Não.
Não houve dificuldade no acesso ao serviço
Não utilizei o serviço.
NÃO
Não
Não.

Figura 11 – Grau de dificuldade de acesso ao serviço.

Fonte: Ouvidoria UFPA.

DISCUSSÃO

Ao analisar as amostras do estudo, verificou-se que 44,7% dos pacientes realizaram os testes em conjunto. Ou seja, fizeram a dosagem de IgG e também a RT-qPCR para ambas as análises. À época não se tinha certeza se apenas o diagnóstico sorológico era suficiente para afirmar a infecção por SARS CoV-2. Também não se sabia com precisão o impacto da determinação do IgG para o diagnóstico da Covid-19. Os testes de IgM não foram padronizados a tempo de entrarem neste estudo, mas foram considerados (assim como IgG) como não plenos para o diagnóstico de doença atual ou antiga em estudos posteriores (Liu et. al, 2020; 2020; Bichara et al, 2021). Mesmo a dosagem de IgG demorou a ser padronizada e foi ofertada depois dos pacientes terem recebido o resultado do RT-qPCR.

A maioria das amostras foi considerada negativa para SARS CoV-2, e apenas 22,01% das 586 amostras foram consideradas positivas para ambos os testes. Deve-se considerar que a população era formada apenas por profissionais expostos a atividades presenciais de contato com o público, o que pode significar que a população estudada já tinha entrado em contato com o vírus e desenvolveram anticorpos para o SARS CoV-2, mas não desenvolveram a doença ou que os indivíduos não desenvolveram anticorpos para SARS CoV-2, mas tinham entrado em contato recente com o vírus, naquele momento de grande circulação e disseminação da virose. Das 586 amostras, as consideradas negativas foram de 386, tanto no IgG quanto no RT-qPCR, sendo seu EI na média de $0,635 \pm DP 0,164$. Assim, pode-se considerar como amostras verdadeiramente negativas, ou seja, que o indivíduo não tinha o vírus no momento da coleta e/ou não formou anticorpos que o limite de detecção do teste pudesse comprovar uma infecção por SARS CoV-2.

Os pacientes RT-qPCR positivos apresentaram 3,5 vezes aumentadas o risco de serem IgGpositivos, o que demonstra pessoas com anticorpo típico de infecção crônica realmente positivas para SARS CoV-2, apresentando a infecção ativa no momento da execução do teste. Este resultado talvez esteja relacionado ao fato de que, na Covid-19, o IgG não seja específico de pacientes no quadro crônico da doença. Possivelmente, esses pacientes já tinham entrado em contato com o vírus e permanecido com o título detectável no momento da coleta ou ainda há a possibilidade que estivessem em uma segunda infecção no momento da coleta destas amostras.

CONCLUSÃO

Por fim, foi elaborado um manual informativo, como forma de comunicar à sociedade os resultados deste trabalho e para a orientação dos profissionais dos laboratórios envolvidos neste estudo no que diz respeito ao atendimento das demandas da sociedade por parte do Programa de Vigilância da Covid-19 na UFPA.

REFERÊNCIAS

AQUINO, E.M.L. *et al.* **Medidas de distanciamento social no controle da pandemia de Covid-19: potenciais impactos e desafios no Brasil.** Ciência e Saúde Coletiva, Bahia, 2020.

BAYHAN, G.I. *et al.* **Effectiveness of CoronaVac in preventing COVID-19 in healthcare workers.** HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS.2022

BICHARA, D.C.A. *etal.* **Assessment of Anti SARS CoV antibodies post CoronavacVaccination in the Amazon region of Brazil.** Vacinnes. 2021.

BICHARA C.D.A, DA SILVA GRAÇA AMORAS E, VAZ G.L., DA SILVA TORRES M.K., QUEIROZ M.A.F., DO AMARAL I.P.C., VALLINOTO I.M.V.C., BICHARA C.N.C., VALLINOTO A.C.R. **Dynamics of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies post-COVID-19 in a Brazilian Amazon population.** BMC Infect Dis. 2021 May 15;21(1):443. doi: 10.1186/s12879-021-06156-x. PMID: 33992073; PMCID: PMC8122196.

BILGIN, *Het al.* **The effect of immunization with inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) and/or SARS-CoV-2 infection on antibody levels, plasmablasts, long-lived-plasma-cells, and IFN- γ release by natural killer cells.** ELSEVIER, 2021.

BORGES, M.C. **Projeto S: a stepped-wedge randomized trial to assess CoronaVac effectiveness in Serrana, Brazil.** Butantan.2021.

BUSTIN AS, NOLAN T. **RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer.** Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 3004; doi:10.3390/ijms21083004 - <https://bit.ly/3zjelXq>. Acesso em: 18/05/2022.

BRASIL. **Lei Nº 13.979, de 6 de fevereiro de 2020** – LEI Nº 13.979, de 6 de fevereiro de 2020. Dispõe sobre as medidas para enfrentamento da emergência de saúde pública de importância internacional decorrente do coronavírus responsável pelo surto de 2019. 2019. Disponível em <https://bit.ly/3hGZaH2>. Acesso em: 18/05/2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria Nº 356, DE 11 DE MARÇO DE 2020** – Dispõe sobre a regulamentação e operacionalização do disposto na Lei nº 13.979, de 6 de fevereiro de 2020, que estabelece as medidas para enfrentamento da emergência de saúde pública de importância internacional decorrente do coronavírus (COVID-19). 2020a - <https://bit.ly/3lBWxr4>. Acesso em: 18/05/2022.

BRASIL. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde - CTIE. **Diretrizes para diagnóstico e tratamento da COVID-19 Versão 3** – Abril de 2020b. Disponível em <https://bit.ly/3IEzxbk>. Acesso em: 18/05/2022.

BRASIL. **Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 04/2020** - orientações para serviços de saúde: medidas de prevenção e controle que devem ser adotadas durante a assistência aos casos suspeitos ou confirmados de infecção pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) – atualizada em 25/02/2021. Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária - <https://bit.ly/3nETmI9>. Acesso em: 18/05/2022.

BRASIL. **Lei Nº 8.080, de 19 de setembro de 1990**. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. 1990. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm Acesso em: 18/05/2022.

BRASIL. **Ministério da saúde. Coronavírus**. Disponível em: <<https://coronavirus.saude.gov.br/sobre-a-doenca#transmissao>>. Acesso em: 08/09/2020.

BRASIL. **Ministério da saúde. Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília-DF, 2020.

BRITO, S.B.P. *et al.* **Pandemia da covid 19: o maior desafio do século XXI**. Revista visa em debate. Bahia, 2020.

BUENO, L.B. *et al.* **Dynamic of humoral response to SARS-CoV-2 anti-Nucleocapsid and Spike proteins after CoronaVac vaccination**. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2022.

CARDOSO, D. M. *et al.* **Análise e caracterização da produção científica sobre a covid-19 e sua associação com a mortalidade e ocorrência de casos**. Revista transformar. Agosto de 2020. ISSN 21758255.

CARVALHO, A.R.V.S. **Epidemiology, diagnosis, treatment, and future perspectives concerning SARS-CoV-2: a review article**. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.66.3.370> > Acesso em: 07/10/2020.

CDC. Center for Disease Control and Prevention (CDC). **Infection Prevention and Control for Patients with Suspected or Confirmed Coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Healthcare Settings**. [Internet]. Atlanta: Center for Disease Control and Prevention; 2020 [revised 2020 dec 04; cited 2021 feb 23]. Disponível em <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/dental-settings.html>

CHIAPELLI, F. KHAKSHOY, A. e GREEBERG, G. **Covid 19 immunopathology and immunotherapy** DOI: **10.6026/97320630016222**.

Coll, S.H. **Effectiveness the coronaVac vaccine in a region of the Colombia Amazon was her immunity achieved?** Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines. 2022.

DADALTO, L., ROYO, M.M. e COSTA, B.S. **Bioética e integridade científica nas pesquisas clínicas sobre Covid-19**. Revista Bioética. Brasília, 2020.

DIAS, H. C. M. V. *et al.* **Testes sorológicos para Covid-19**. *Jornal of Infection Control*. 2020 Vol.9 N.2.

DINC, H. O. *et al.* **Inactive SARS CoV vaccine generates high antibody responses in healthcare workers with and without prior infection**. *Vaccine*. Elsevier. 2021.

ENGELBRECHT FA, SCHOLLES RJ. **Test for Covid-19 seasonality and the risk of second waves**. *One Health*. 2021 Jun;12:100202. doi: 10.1016/j.onehlt.2020.100202. Epub 2020 Nov 29. PMID: 33283035; PMCID: PMC7700765.

ESTADO DE MINAS Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/internacional/bbc/2022/03/17/interna_internacional,1353340/covid-por-que-china-volta-a-estacionar Acesso em: 17/05/2022.

FABRI, A. C. O. C. et al. **Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region.** BMC Infectious Diseases, London, v. 15, p. 218, mai. 2015.

GUO *et al.* **The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – na update on the status.** Military medical research.2020.

IGLESIA, L.D.L.J. *et al.* **Predictive factors of Covid-19 in patients with negative RT-qPCR.** Medicina de família. Elsevier. 2020. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.semerg.2020.06.010>>Acesso em: 08/09/2020.

ISHIGE, T.*etal.* **Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories.** Clinicachimicaacta.Elsevier. 2020.

JÚNIOR, E.D.M.*et al.* **Safety and Efficacy of a third dose of BNT162b2 Covid-19 vaccine.** The England journal of medicine.Março de 2022.

KINLOCH, N. N.*et al.* Suboptimal biological sampling as a probable of false-negative Covid-19 diagnostic test results.Thejournal of infectious diseases. 2020.

KJELLBERG A, DOUGLAS J, PAWLIK MT, KRAUS M, OSCARSSON N, ZHENG X, BERGMAN P, FRÅNBERG O, KOWALSKI JH, NYREN SP, SILVANIUS M, SKOLD M, CATRINA SB, RODRIGUEZ-WALLBERG KA, LINDHOLM P. **Randomised, controlled, open label, multicentre clinical trial to explore safety and efficacy of hyperbaric oxygen for preventing ICU admission, morbidity and mortality in adult patients with COVID-19.** BMJ Open. 2021 Jul 5;11(7):e046738. doi: 10.1136/bmjopen-2020-046738. PMID: 34226219; PMCID: PMC8260306.

LI, C. *et al.* **Laboratory diagnosis of coronavirus disease-2019 (COVID-19).** Clinicachimicaacta. Elsevier. 2020.

LIMA,E.J.F *et al.* Reflexões sobre o uso das vacinas para COVID-19 em crianças e adolescentes. **Epidemiol. Serv. Saude. Brasília. 20210020040030030030030030035.**

LIPPI G., PLEBANNI, M. **The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (Covid-19) and other viral outbreaks.**Clinicalchemistryandlaboratory medicine. Disponível em: <<https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0240>> Acesso em : 15/09/2020.

LIPPI, G., PLEBANI, M.**Resiliência dos laboratórios clínicos durante a pandemia de coronavírus 2019 (Covid-19).**J BrasPatolMed Lab. 2020.

LIU X, WANG J, XU X, LIAO G, CHEN Y, HU CH. **Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients.** EmergMicrobesInfect. 2020;9(1): 1269–74. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1773324>.

MAGALHÃES, S.SARS-Cov-2: **diagnóstico laboratorial.** Acta farmacêutica portuguesa 2020, vol. 9, n.1, pp.32-37.

MAGNO, L.*et al.* **Desafios e propostas para ampliação da testagem e diagnóstico da Covid-19 no Brasil.** Revista ciência e saúde coletiva. 2020.

MARINELLI, P.N. *etal.***Protocolo de manejo clínico do Covid-19: por que tantas mudanças?** Revista cuidar. 2020.

MARQUES, R. e RAIMUNDO, J.A. **O negacionismo científico refletido na pandemia de Covid-19.** Boa vista. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Caderno de ações para a vigilância e assistência à saúde das condições pós covid no âmbito do Ministério da Saúde.** Brasília, DF; 2022.

MONTE, L.M. *et al.* **Complicações atípicas e características clínico-epidemiológicas do Covid-19: uma revisão integrativa.** Revista eletrônica acervo saúde.

MUENA, N.A. *et al.* **Induction of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies by CoronaVac and BNT162b2 vaccines in naïve and previously infected individuals.** Ebiomedicine.2022.

NETTO, F.G.R; CORRÊA, N.W. J. **Epidemiologia do surto de doença por coronavírus (Covid-19). Revista desafios.** 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.20873/uftsuple2020-8710>> Acesso em: 15/09/2020.

NETTO, R.G.F. e CORREA, J.W.N. **Epidemiologia por surto de doença coronavírus.** Revistadesafios. Manaus, 2020.

NICOL, T. *et al.* **Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech).** Journal of Clinical Virology. Elsevier. 2020.

OLIVEIRA, A. B. *et al.* **SARS CoV-2 and the Covid-19 disease: a mini review on diagnostic methods.** Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo. 2020. Disponível em: <<http://doi.org/10.1590/S1678-9946202062044>> Acesso em: 08/09/2020.

OLIVEIRA, S. E, MATOS, F. M., MORAIS, N. L. C. A. **Perspectiva de resultados falso-negativos no teste de RT-PCR quando realizado tardiamente para o diagnóstico de Covid-19.** Interamerican Journal of medicina and health. Disponível em: <<https://doi.org/10.31005/iajmh.v3i0.90>> Acesso em: 08/09/2020.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Protocolos da OMS para diagnóstico laboratorial da COVID-19 - Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR 2020** – Disponível em <https://bit.ly/39c4PQQ>

OPAS. Organização panamericana de saúde. **Exames laboratoriais para a doença causada pelo novo coronavírus de casos suspeitos em humanos.** Mar 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19>>. Acesso em: 08/09/2020.

PIZZOL, D. L. J. *et al.* **Laboratory diagnosis for Covid-19: A mini-review.** Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine. Vol 53. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0451-2020>> Acesso em: 08/09/2020.

QUINTELLA, C.M. *et al.* **Vacinas para Coronavírus (Covid-19, SARS CoV-2): mapeamento preliminar de artigos, patentes, testes clínicos e mercado.** Cadernos de prospecção. Bahia. 2020.

Recomendações provisórias para o uso da vacina AZD 1222 (CaAdOx1-S recombinante contra covid 19, desenvolvida pela Universidade de Oxford e Secretaria de estado de saúde pública (SESPA). Casos de coronavírus no Pará. Disponível em: <<https://www.covid-19.pa.gov.br/#/>>. Acesso em: 14/09/2020.

SEO, G. *et al.* **Rapid detection of Covid-19 causative virus (SARS CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using Field-effect transistor based biosensor.** ACS nano. 2020. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1021/acsnano.0c02823>> Acesso em: 08/09/2020.

SESPA. **Coronavírus.** Disponível em: <http://www.saude.pa.gov.br/rede-sespa/coronavirus> Acesso em: 18/05/2022.

Silva, A.W.C. *et al.* **Perfil epidemiológico e determinante social da covid-19 em Macapá – Amapá.** Revista científica multidisciplinar núcleo do conhecimento. 2020.

SILVA, C.T. et al. **Effectiveness of Coronavac, ChAdOx1n Cov-19, BNT162b2, and Ad26.Cov 2.S among individuals with previous SARS CoV-2 infection in Brazil: a teste negative, case control study.** The lancet infectious disease. 2021.

SILVA, D.F. e OLIVEIRA, M.F.C. **Epidemiologia da covid-19: comparações entre boletins epidemiológicos.** Comunicação em ciências da saúde. 2020.

SURYATMA, A. et al. **Effectiveness of the Inactivated COVID-19 Vaccine (CoronaVac) in Adult Population in Bali, Indonesia.** 2021.

TAJIMA, Y., YASUO S., YANO, K. et al. **A case report of SARS-CoV-2 confirmed in saliva specimen upto 37 days after onset: Proposal of saliva specimens for COVID-19 diagnosis and virus monitoring.** Journal of Infection and Chemotherapy. Elsevier. 2020.

TANG, W. Y et al. **Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges.** Journal of clinical microbiology. 2020.

TEICH, V. D. et al. **Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes com Covid-19 no Brasil.** Instituto israelita de ensino e pesquisa Albert Einstein. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO6022> Acesso em: 07/10/2020.

VALLINOTO A.C.R., DA SILVA TORRES M.K., VALLINOTO M.C., CAYRES VALLINOTO I.M.V. **The challenges of COVID-19 in the Brazilian Amazonian communities and importance of seroepidemiological surveillance studies.** Int J Equity Health. 2020;19(1):140. <https://doi.org/10.1186/s12939-020-01256-7>.

VIEIRA, L. M. F., EMERY, E., ANDRIOLO A., **Covid-19 Diagnóstico laboratorial para clínicos.**

WU, Di et al. **The SARS-CoV-2 outbreak: What we know.** International journal of infectious diseases. 2020.

XAVIER, R. A. et al. **Covid-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus.** J Bras Patol Med Lab. 2020; 56: 1-9.

YANG S, STANZIONE N, USLAN DZ, GARNER OB, DE ST MAURICE A. **Clinical and Epidemiologic Evaluation of Inconclusive COVID-19 PCR Results Using a Quantitative Algorithm.** Am J Clin Pathol. 2021 Feb 11;155(3):376-380. doi: 10.1093/ajcp/aqaa251. PMID: 33274731; PMCID: PMC7799210.

ZAO, WEI. et al. **Status of Humoral and Cellular Immune Responses within 12 months Following CoronaVac Vaccination against COVID-19.** 2021.

ZEN, Y et al. **Dynamic SARS CoV-2-specific and T cell responses following imunization with an inactivated Covid-19 vaccine.** Clinical microbiology and infection. Elsevier. 2021.