

ORIENTAÇÃO

NÚMERO: 015/2020

DATA: 23/03/2020

ASSUNTO: **COVID-19: Diagnóstico Laboratorial**

PALAVRAS-CHAVE: Diagnóstico laboratorial; amostras biológicas

PARA: Profissionais do Sistema de Saúde

CONTACTOS: Direção de Serviços de Prevenção da Doença e Promoção da Saúde:
dspdps@dgs.min-saude.pt
Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus
Respiratórios: resinsa@insa.min-saude.pt

Nos termos da alínea a) do nº 2 do artigo 2º do Decreto Regulamentar nº 14/2012, de 26 de janeiro, emite-se a Norma seguinte:

1. Diagnóstico laboratorial

- a. Todos os casos suspeitos de infeção pelo Novo Coronavírus (SARS-CoV-2) devem ser submetidos a diagnóstico laboratorial. O diagnóstico laboratorial será realizado, preferencialmente, em laboratório hospitalar da Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico do SARS-CoV-2, na rede complementar de laboratórios privados ou no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) – laboratório de referência nacional (Anexo I);
- b. As amostras biológicas (Anexo II) são enviadas ao laboratório o mais rapidamente possível, preferencialmente em ambiente refrigerado (Anexo III), logo após a colheita da amostra biológica;
- c. A deteção laboratorial do SARS-CoV-2 é feita por PCR em tempo real (RT-PCR).^{1,2}

2. Colheita de amostras biológicas

- a. A colheita de amostras biológicas (Anexo IV) deve ser efetuada por profissionais devidamente habilitados para a realização da colheita, conservação e acondicionamento das amostras biológicas;
- b. Os profissionais de saúde que realizem colheitas de amostras biológicas devem cumprir com rigor as recomendações de utilização de equipamento de proteção individual (Anexo V);

¹ WHO (2020). Laboratory Testing for 2019 novel Coronavirus in suspected human cases. WHO. Disponível em: <https://www.who.int/healthtopics/coronavirus/laboratory-diagnostics-for-novel-coronavirus>

² A possibilidade de realização do diagnóstico SARS-CoV-2 por novos métodos de diagnóstico será atualizada, nomeadamente, por testes de diagnóstico rápido que venham a ser validados e disponibilizados no mercado português.

- c. É fortemente recomendado que sejam colhidas amostras do trato respiratório inferior, sobretudo em doentes com doença mais grave;
- d. Uma única amostra do trato respiratório superior pode não excluir a infeção, sendo preferível o envio de duas amostras respiratórias de locais diferentes;
- e. Para o diagnóstico de COVID-19 está indicada a colheita de amostras do trato respiratório (superior e/ou inferior, de acordo com o contexto clínico), podendo estas ser completadas, para fins de controlo ou de estudo, por colheita de soro ou de outras amostras.

2.1. Amostras respiratórias

Devem ser colhidas amostras respiratórias:

a. Trato respiratório superior

- i. Exsudado da nasofaringe e exsudado da orofaringe colhido com zaragatoa em meio de transporte para vírus. As duas amostras colhidas com zaragatoas devem ser colocadas no mesmo tubo contendo meio de transporte para vírus (2-3 ml). Deve dar-se prioridade à colheita do exsudado da nasofaringe, quando não for possível a colheita dos dois exsudados;
- ii. Expetoração (se existente).

b. Trato respiratório inferior

- i. Aspirado endotraqueal ou lavado bronco-alveolar, em doentes com doença respiratória grave.

Se analisada apenas um tipo de amostra, com resultado laboratorial negativo para COVID-19, em doentes internados e se o agravamento da doença o justificar, é recomendada a colheita de uma segunda amostra para o diagnóstico laboratorial.

Em **idade pediátrica**: deve colher-se uma amostra de exsudado da nasofaringe e uma amostra de exsudado da orofaringe.

a. Instruções de colheita dos exsudados:³

- i. Exsudado da nasofaringe: Inserir a zaragatoa numa das narinas paralelamente ao palato até sentir uma ligeira resistência. Deixar a zaragatoa durante alguns segundos para absorção das secreções. Remover lentamente com movimento de rotação. Repetir a colheita na outra narina.
- ii. Exsudado da orofaringe: Inserir a zaragatoa na cavidade oral até à faringe posterior, evitando tocar na língua.

³ Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), CDC, 19 março, 2020

2.2. Soro

- Duas amostras de soro de fase aguda e de convalescença (2-4 semanas após fase aguda) para a realização de testes serológicos;
- Os testes serológicos poderão suportar a investigação futura dos casos de infeção pelo SARS-CoV-2. Devem ser utilizados em complemento do diagnóstico por biologia molecular (RT-PCR).

2.3. Outras amostras

- Em indivíduos assintomáticos com contacto próximo com doente com infeção COVID-19 confirmado, realizar a colheita de amostras do trato respiratório superior e uma amostra de soro, se houver indicação para tal;
- Em doentes falecidos, considerar a análise de amostras respiratórias e material de autópsia incluindo material de tecido pulmonar, se a autópsia for considerada necessária⁴;
- Em doentes sobreviventes considerar a colheita e conservação de um par de soros (fase aguda e de convalescença) para o estudo imunitário retrospectivo.

3. Comunicação com o laboratório

Para assegurar uma boa comunicação com o laboratório, o laboratório deve ser informado da proveniência das amostras biológicas. As amostras devem ser corretamente identificadas e acompanhadas da notificação do SINAVE com a informação relativa ao doente, se aplicável.

4. Condições de segurança no acondicionamento e transporte de amostras biológicas

Os profissionais de saúde devem cumprir as regras de prevenção e controlo de infeção aplicáveis bem como a correta e adequada utilização de EPI, de acordo com a Orientação n.º 003/2020 da DGS e o Anexo V da presente Orientação.

De modo a acondicionar e transportar corretamente as amostras, deve proceder-se da seguinte forma:

- Após a colheita de amostras biológicas, os tubos e recipientes devem ser bem vedados;
- Os tubos e recipientes devem ser desinfetados exteriormente, no local da colheita, com solução de hipoclorito de sódio a 1% - 10.000ppm (1 parte de hipoclorito de sódio em 9 partes iguais de água) e de seguida, com álcool a 70%;
- Por fim, a tampa do tubo deve ser selada com película parafilme;

⁴ Consultar Norma n.º 002/2020 de 16/03/2020 atualizada a 19/03/2020, disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0022020-de-16032020.aspx>

- d. Acondicionar as amostras biológicas, seguindo as normas de embalagem de substâncias infecciosas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde⁵ para amostras classificadas de categoria B (UN 3373);
- e. Utilizar o sistema de embalagem tripla com as seguintes características:
 - i. **Contentor primário** é o que contém a amostra; deve estar devidamente identificado e tem de ser estanque a líquidos e a sólidos; tem de ser embalado em material absorvente suficiente para absorver todo o conteúdo em caso de quebra ou derrame;
 - ii. **Contentor secundário** é o que leva os contentores primários (tubos de amostras) e é resistente, à prova de água e estanque a líquidos e a sólidos; pode conter vários tubos de amostras desde que estes sejam protegidos com material absorvente e amortecedor, individualmente e separados, a fim de evitar o contacto;
 - iii. **Contentor exterior** é a embalagem de transporte externa com material de acolchoamento adequado, onde se colocam os contentores secundários. A menor dimensão externa global utilizada deve ser de 10 x 10 cm.
- f. O transporte das amostras deve ser realizado, preferencialmente, por uma empresa certificada e autorizada para o efeito (Categoria B, UN 3373) ou em alternativa, em transporte próprio da unidade de saúde, cumprindo as indicações de acondicionamento anteriormente referidas;
- g. Este procedimento é da responsabilidade da unidade de saúde que realiza a colheita das amostras biológicas e deve ser acompanhado de impressão da notificação efetuada no SINAVE.

5. Testes laboratoriais

O tratamento das amostras biológicas e a inativação do RNA viral deve ser realizada em laboratório com câmara de biossegurança de nível 2 (BSL-2).

5.1. PCR em tempo-real para o SARS-CoV-2

O diagnóstico específico do novo coronavírus é realizado pela metodologia de amplificação dos ácidos nucleicos, pela reação de polimerase em cadeia (PCR).

O teste PCR para a deteção do novo coronavírus deverá incluir pelo menos um dos seguintes testes:

⁵WHO (2020). Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019–2020. WHO. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325884/WHO-WHE-CPI-2019.20-eng.pdf>

IATA (2011). PACKING INSTRUCTION 650. IATA. Disponível em:

<https://www.iata.org/contentassets/b08040a138dc4442a4f066e6fb99fe2a/dgr-61-en-pi650.pdf>

- a. Teste de *screening*, que permita a deteção do sub-género Sarbecovirus (SARS-CoV, SARS-CoV-2 e outros coronavírus de origem animal);
- b. Teste confirmatório, específico para o novo coronavírus SARS-CoV-2.

Um caso confirmado laboratorialmente apresentará as duas reações de PCR positivas. As amostras duvidosas ou que necessitem de análise complementar devem ser enviadas ao Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios do Departamento de Doenças Infecciosas, do INSA.

Em áreas onde existe transmissão comunitária ativa de COVID-19, a deteção dos casos por um único teste discriminatório, pela metodologia de RT-PCR para um alvo, será considerada suficiente⁶. Os testes confirmatórios devem ser realizados apenas para resultados inconclusivos ou com um valor de ciclo de amplificação do RT-PCR superior a 35. Recomenda-se nestes casos a repetição do teste e/ou da colheita da amostra biológica.

Os laboratórios da Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico do novo coronavírus devem enviar ao INSA todas as amostras positivas para SARS-CoV-2 e as 5 primeiras amostras negativas para avaliação da comparabilidade de resultados.

5.2. Sequenciação do genoma viral^{6,7}

A metodologia de sequenciação de nova geração (NGS) está disponível no INSA, para a realização do estudo do genoma do SARS-CoV-2.

Para além da confirmação de casos de infeção pelo SARS-CoV-2, a integração da análise genómica do novo coronavírus com a informação epidemiológica e clínica dos casos de COVID-19 é crítica para o estudo e controlo da transmissão do vírus na comunidade, monitorização da doença e de marcadores genómicos associados à gravidade da doença.

O conhecimento do genoma viral permite ainda avaliar o desempenho dos testes de diagnóstico laboratorial.

É fortemente recomendada a partilha das sequências virais em bases de dados, como o GISAID, que garantem os direitos de autor e de submissão.

Devem ser enviadas ao Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios do Departamento de Doenças Infecciosas, do INSA, para sequenciação do genoma viral todas as amostras positivas de casos de COVID-19.

⁶ ECDC. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update, ECDC, 12 março, 2020. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf>

⁷ Plano Nacional de Preparação e Resposta à Doença por novo coronavírus (COVID-19), DGS, 2020. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/plano-nacional-de-preparacao-e-resposta-para-a-doenca-por-novo-coronavirus-covid-19-pdf.aspx>

A caracterização virológica deverá incluir sequências de vírus que representem diferentes momentos da epidemia, grupos etários e áreas geográficas⁸.

6. Monitorização laboratorial de casos confirmados⁹

Recomenda-se o envio ao INSA de colheitas sequenciais de amostras respiratórias e de outras origens para o estudo da duração da excreção do vírus.

O RNA viral pode permanecer detetável em fluídos corporais do doente por longo período de tempo, não significando que o vírus se encontre no seu estado infeccioso⁵.

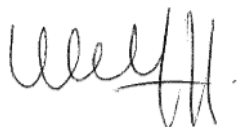
Os critérios para libertação do isolamento consensualizados pelo ECDC⁵ implicam:

- a. Evidência de amostras do trato respiratório superior negativas para SARS-CoV-2;
- b. Resolução da sintomatologia.

O critério para a declaração da completa eliminação do vírus e resolução da doença COVID-19 implica:

- a. Pelo menos 2 amostras do trato respiratório superior negativas para SARS-CoV-2, colhidas com um intervalo de 24h:
 - i. Em doentes que foram sintomáticos e após a resolução dos sintomas (após 3 ou mais dias sem febre e sem outra sintomatologia) - colher duas amostras (com intervalo de 24 horas), pelo menos 7 dias após o início dos sintomas iniciais;
 - ii. Em doentes assintomáticos com infeção por SARS-CoV-2 (teste inicial positivo para SARS-CoV-2), colher duas amostras (com intervalo de 24 horas) no mínimo 14 dias após o resultado laboratorial positivo inicial.

Devido à crescente evidência de excreção do vírus através das fezes de doentes em fase de convalescença, particularmente nas crianças, recomenda-se um reforço da higiene pessoal após libertação do isolamento.



Graça Freitas
Diretora-Geral da Saúde

⁸ Plano Nacional de Preparação e Resposta à Doença por novo coronavírus (COVID-19), DGS, 2020. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/plano-nacional-de-preparacao-e-resposta-para-a-doenca-por-novo-coronavirus-covid-19-pdf.aspx>

⁹ ECDC. Novel coronavirus (SARS-CoV-2) Discharge criteria for confirmed COVID-19 cases – When is it safe to discharge COVID-19 cases from the hospital or end home isolation? ECDC Technical Report, 10 março, 2020

Referências bibliográficas

CDC. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). CDC. 19 march, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>

DGS. Norma nº 002/2020 de 16/03/2020 atualizada a 19/03/2020, disponível em <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0022020-de-16032020.aspx>

DGS. Plano Nacional de Preparação e Resposta à Doença por novo coronavírus (COVID-19), DGS, 2020. Disponível em: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/plano-nacional-de-preparacao-e-resposta-para-a-doenca-por-novo-coronavirus-covid-19-pdf.aspx>

ECDC. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – sixth update 12 March 2020. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-sixth-update-Outbreak-of-novel-coronavirus-disease-2019-COVID-19.pdf>

ECDC. Novel coronavirus (SARS-CoV-2) Discharge criteria for confirmed COVID-19 cases – When is it safe to discharge COVID-19 cases from the hospital or end home isolation? ECDC Technical Report, 10 março, 2020

IATA (2011). PACKING INSTRUCTION 650. IATA. Disponível em: http://www.iata.org/whatwedo/cargo/dgr/Documents/DGR52_PI650_EN.pdf

WHO (2020). Laboratory Testing for 2019 novel Coronavirus in suspected human cases. WHO. Disponível em: <https://www.who.int/healthtopics/coronavirus/laboratory-diagnostics-for-novel-coronavirus>

Anexo I

Laboratórios com capacidade para diagnóstico laboratorial (sujeito a atualização contínua)

Laboratórios
Laboratório Nacional de Referência
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I. P. - Lisboa
ARS Norte
Centro Hospitalar Universitário de S. João, E.P.E. - Porto
Centro Hospitalar Universitário do Porto, E.P.E. - Porto
Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho, E.P.E. - Gaia
Hospital da Senhora da Oliveira Guimarães E.P.E. - Guimarães
Unidade Local de Saúde de Matosinhos, E.P.E. - Hospital Pedro Hispano - Matosinhos
Hospital de Braga, E.P.E. - Braga
ARS Centro
Centro Hospitalar Universitário de Coimbra, E.P.E. - Coimbra
Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E. - Covilhã
Unidade Local de Saúde da Guarda, E.P.E., - Guarda
ARS Lisboa e Vale do Tejo
Centro Hospitalar e Universitário de Lisboa Central, E.P.E. - Lisboa
Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Norte, E.P.E. - Lisboa
Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, E.P.E. - Lisboa
ARS Alentejo
Hospital Espírito Santo de Évora, E.P.E. - Évora
ARS Algarve
Laboratório Regional de Saúde Pública Dra. Laura Aires - Faro
Região Autónoma dos Açores
Hospital de Santo Espírito da Ilha Terceira, E.P.E.R. - Ilha Terceira
Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada, E.P.E. - Ilha de S. Miguel
Região Autónoma da Madeira
Serviço de Saúde da RAM, E.P.E. - Hospital Dr. Nélio Mendonça - Ilha da Madeira
Rede complementar de laboratórios privados

Anexo II Colheita de amostras biológicas

	Diagnóstico laboratorial	Tipo de amostra	Amostras biológicas	Momento da colheita	Observações
Doente	RT-PCR	Trato respiratório superior	Exsudado da nasofaringe Exsudado da orofaringe Expetoração	Fase inicial da doença Colheita no momento de alta hospitalar	Zaragoas da naso e orofaringe devem ser colocadas no mesmo tubo com meio de transporte viral
		Trato respiratório inferior	Lavado bronco-alveolar Aspirado endotraqueal		-----
	Serologia	Soro	Um par de soros	Soro de fase inicial e soro de fase de convalescença	Amostra de importante valor para futuro diagnóstico laboratorial e avaliação da imunidade
Contactos (surtos em unidades de saúde ou sintomáticos em outras instituições ou assintomáticos com estreito contacto com casos confirmados de COVID-19)	RT-PCR	Trato respiratório superior	Exsudado da nasofaringe Exsudado da orofaringe	Período de incubação do último contacto	Zaragoas da naso e orofaringe devem ser colocadas no mesmo tubo com meio de transporte viral
	Serologia	Soro	Um par de soros	Soro de fase inicial (colhido o mais cedo possível durante o período de incubação) e soro de convalescença (2-4 semanas após o contacto)	

Anexo III Transporte e acondicionamento de amostras biológicas

Tipo de amostra	Dispositivo de colheita	Transporte	Acondicionamento	Observações
Exsudado da nasofaringe e orofaringe	Zaragatoa de dracon ou floculada	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	Zaragatoas da naso e orofaringe devem ser colocadas no mesmo tubo com meio de transporte viral
Expetoração	Contentor estéril	2-8°C	≤48 horas: 2-8°C ≥48 horas: -70°C	
Lavado bronco-alveolar	Contentor estéril	2-8°C	≤48 horas: 2-8°C ≥48 horas: -70°C	Amostra de importante valor para o diagnóstico laboratorial
Aspirado endotraqueal, nasofaríngeo, ou lavado nasal	Contentor estéril	2-8°C	≤48 horas: 2-8°C ≥48 horas: -70°C	
Soro	Tubo seco (3-5 ml)	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	Pares de soros: agudo-1ª semana de doença; convalescença-2-3 semanas depois)
Tecidos de biópsia	Contentor estéril com soro fisiológico ou meio de transporte para vírus	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	
Fezes	Contentor estéril	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	
Urina	Contentor estéril	2-8°C	≤5 dias: 2-8°C ≥5 dias: -70°C	

Anexo IV

Diagnóstico laboratorial do novo coronavírus em casos suspeitos sob investigação Procedimento para a realização de colheita de amostras biológicas e encaminhamento ao laboratório

I. Local: Unidade de saúde realiza a colheita de amostras biológicas para o diagnóstico laboratorial do Novo Coronavírus em casos suspeitos sob investigação.

II. Equipamento de proteção individual (EPI): bata impermeável ou fato de proteção integral, touca, respirador FFP2, proteção ocular, luvas, proteção de calçado.

III. Amostras Respiratórias: Devem ser enviadas 2 amostras biológicas respiratórias de diferente natureza para o diagnóstico do Novo Coronavírus (COVID-19). Juntar formulário **de notificação SINAVE-clínico**.

2 das seguintes Amostras Respiratórias:

- Exsudado da nasofaringe colhido com zaragatoa;
- Exsudado da orofaringe colhido com zaragatoa;
- Expetoração;
- Aspirado endotraqueal.

mesmo tubo
contendo meio
de transporte
viral

Quando não for possível a colheita dos dois exsudados, deve dar-se prioridade à colheita do exsudado da nasofaringe

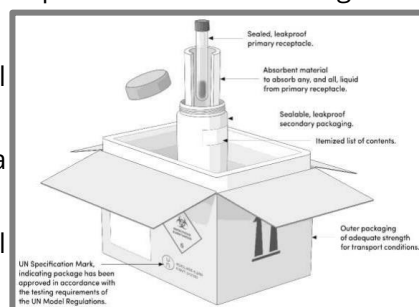
IV. Instruções de colheita dos exsudados:

- **Exsudado da nasofaringe:** Inserir a zaragatoa numa das narinas paralelamente ao palato até sentir uma ligeira resistência. Deixar a zaragatoa durante alguns segundos para absorção das secreções. Remover lentamente com movimento de rotação. Repetir a colheita na outra narina.
- **Exsudado da orofaringe:** Inserir a zaragatoa na cavidade oral até à faringe posterior, evitando tocar na língua.

V. Acondicionamento de produtos biológicos:

Desinfetar exteriormente os tubos e recipientes no local da colheita. Selar com parafilme as tampas dos tubos. Utilizar sistema de embalagem tripla (categoria B, UN 3373). Transporte em ambiente refrigerado.

- **Contentor primário** (contém a amostra, envolver em material absorvente e colocar em saco plástico);
- **Contentor secundário** (resistente, à prova de água, estanque a líquidos e sólidos);
- **Contentor exterior** (embalagem de transporte externa, material acolchoado, dimensão mínima 10x10 cm).



VI. Transporte:

Preferencialmente por empresa autorizada para o transporte de substâncias de categoria B (UN 3373), ou em transporte próprio da unidade de saúde.

Anexo V

Equipamento de Proteção Individual (EPI) de acordo com o nível de cuidados a prestar

EPI para a colheita de amostras biológicas	
Equipamento	Características
Fato de bloco operatório, se aplicável	- Composto por calças e túnica reutilizável (opcional)
Bata de laboratório, se aplicável	- Reutilizável
Respirador FFP2*	- Uso único
Óculos de proteção ou viseira de proteção facial total	- Reutilizável, após descontaminação
Bata impermeável	- Uso único
Luvas	- Uso único - 2 pares (trocar as luvas sempre que necessário) - 2 tipos de luvas: Primeiro par de nitrilo (300 mm) e segundo par de nitrilo ou latex, que cubra com uma boa margem o punho da bata)

*Para uma otimização dos respiradores:

- O profissional que faz as colheitas, pode permanecer com o mesmo respirador desde que seja escalado apenas para esta função, ou seja, num turno faz apenas colheitas de amostras respiratórias;
- O respirador tem uma durabilidade que pode ir de 4-6 horas;
- Caso o respirador fique húmido, deve ser substituído.