

NOTA TÉCNICA Nº 1

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA SARS-CoV-2 (COVID-19)

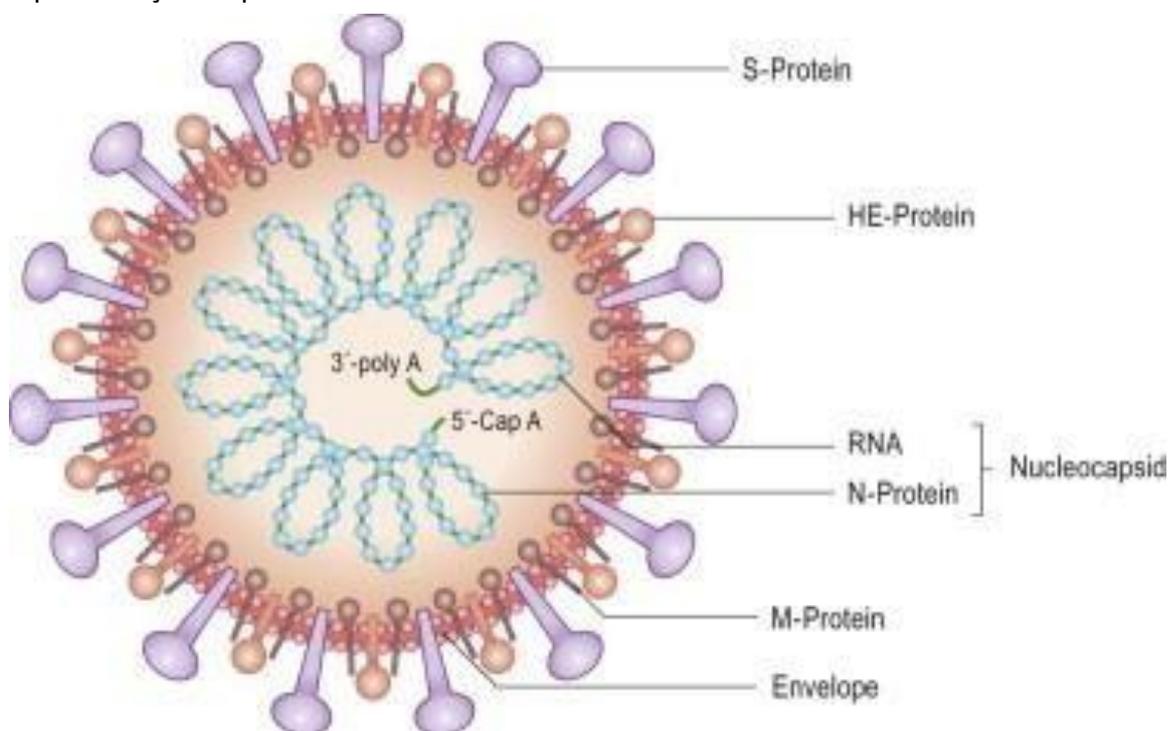
1. Considerações gerais

Os **coronavírus** são um grupo de vírus de genoma de RNA simples de sentido positivo (serve diretamente para a síntese proteica), conhecidos desde meados dos anos 1960. Pertencem à subfamília taxonômica **Orthocoronavirinae** da família Coronaviridae, da ordem Nidovirales.

Nome do vírus: SARS-CoV-2

Nome da doença: COVID-19

Representação esquemática da estrutura do coronavírus:



Existem sete cepas conhecidas de coronavírus humanos, e todas elas evoluíram de Coronavírus de outros animais.

Nome da cepa	Descoberta	Origem evolutiva	Doença causada
HCoV-229E	1960	O coronavírus humano 229E divergiu do coronavírus da alpaca antes de 1960.	Resfriado comum.
SARS-CoV	2002	O coronavírus humano SARS divergiu do coronavírus de morcego em 1986.	Doença SARS .
HCoV-OC43	2004	O coronavírus humano OC43 divergiu do coronavírus bovino em 1890.	Resfriado comum.

HCoV-NL63	2004	O coronavírus humano NL63 divergiu do coronavírus de morcego 822 anos atrás.	Resfriado comum.
HCoV-HKU1	2005	O coronavírus humano HKU1 divergiu do coronavírus de morcego .	Resfriado comum.
MERS-CoV	2012	O coronavírus humano MERS divergiu do coronavírus de morcego antes dos anos 90 e transmitido aos humanos pelos camelos .	Doença MERS .
SARS-CoV-2	2019	<p>1 - Um estudo genético inicial sugeriu que o SARS-CoV-2 tenha divergido do coronavírus de cobras. Porém, cientistas questionaram a possível origem.</p> <p>2 - Estudos posteriores sugeriram que o vírus tenha divergido da versão que parasita morcegos e transmitido aos humanos por um animal ainda desconhecido.</p> <p>3 - Estudos recentes indicam que o vírus tenha divergido da versão que parasita pangolins, pois possui material genético 90% igual ao do vírus encontrado neste animal.</p>	Doença Covid-19 .

A maioria das pessoas se infecta com os coronavírus comuns ao longo da vida. Eles são uma causa comum de infecções respiratórias brandas a moderadas de curta duração. Entre os coronavírus encontra-se o vírus causador da forma de pneumonia atípica grave conhecida por SARS, como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARSCoV). Também é o vírus causador da Covid-19 (SARS-CoV2) e responsável pela pandemia de COVID19 em 2019 e 2020.

Até onde se sabe, a transmissão se dá de pessoa para pessoa, por contato com gotículas, aerossóis e qualquer objeto inanimado contendo partículas virais. Além disso, evidências crescentes apontam para a rota de transmissão fecal-oral.

O SARS-CoV2, assim como o SARS-COV, se liga aos receptores da enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA 2) humana, o que permite sua entrada na célula do hospedeiro. A alta afinidade do SARS-CoV2 com a ECA 2 humana, pode estar relacionada à alta transmissibilidade do novo CoV.

Os sinais clínicos são febre, calafrios, dor de cabeça, mal-estar, dores no corpo, congestão nasal, garganta inflamada, podendo apresentar diarreia. Ocorre também tosse seca não produtiva, podendo evoluir para pneumonia e hipóxia e necessitar ventilação mecânica para manter os níveis normais de oxigênio. Muitos pacientes apresentam febrícula e não apresentam acometimento do trato respiratório superior como rinorréia, congestão nasal, e outras manifestações.

2. Notificação de casos suspeitos de Coronavírus

A infecção humana ocasionada pelo Novo Coronavírus (COVID-19) representa uma grave Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), segundo anexo II do Regulamento Sanitário Internacional, sendo assim, um evento de saúde pública de notificação imediata.

A realização da notificação deve ser realizada de forma imediata através do meio de comunicação mais rápido e disponível, em até 24 horas a partir do conhecimento do caso, se enquadrando na definição de caso suspeito de paciente infectado pelo novo coronavírus, como determina a Portaria de Consolidação Nº 04, Anexo V, Capítulo I, Seção I (<http://j.mp/portariadeconsolidacao4ms>).

O Ministério da Saúde disponibiliza em seu site todas as informações sobre protocolos, manejos, hospitais de referência e boletins sobre coronavírus através do endereço eletrônico <https://coronavirus.saude.gov.br/>

3. O CoV-2 e o laboratório

Os laboratórios de análises clínicas são indispensáveis em muitas condutas médicas e, no caso do coronavírus, o laboratório é responsável pela comprovação etiológica.

Todo exame laboratorial passa por 3 fases sequenciais e interdependentes: fase pré-analítica, analítica e pós-analítica.

As fases pré-analíticas e pós-analítica podem ser verificadas no endereço: <http://www.sbac.org.br/wp-content/uploads/2020/04/Corona-CFF-SBAC.pdf>

4. O CoV-2 e o laboratório – fase analítica

Os testes disponíveis atualmente são:

4.1. Teste molecular

O diagnóstico laboratorial da COVID-19 disponível até o momento, considerado padrão ouro, é a metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase de transcrição reversa quantitativa em tempo real ou qRT-PCR (do inglês Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) realizada com amostras do trato respiratório superior e inferior.

Os laboratórios que pretendem executar a metodologia qRT-PCR devem validar seus testes junto a um dos laboratórios de referência ligados à CGLAS- Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública.

4.2. Teste imunocromatográfico - pesquisa de antígeno

Este teste pesquisa a presença de antígenos do SARS-CoV-2 em amostras coletadas de nasofaringe, utilizando a fluorescência como método de leitura da reação.

O fabricante recomenda que a amostra seja testada imediatamente após a coleta, mas cita que, “embora não recomendado, a amostra pode ser armazenada entre 2º e 8ºC por até 48 horas”.

4.3. Teste imunocromatográfico – pesquisa de anticorpos

O teste sorológico procurará a presença de anticorpos, que são proteínas específicas produzidas em resposta a infecções. Os anticorpos podem ser encontrados no sangue e em outros tecidos das pessoas que testaram positivas para a infecção pelo método qRT-PCR. Os anticorpos detectados por este teste indicam que uma pessoa teve uma resposta imune ao SARS-CoV-2, desenvolvida a partir da infecção. *Os resultados dos testes de anticorpos são importantes na detecção de infecções em pessoas com pouco ou nenhum sintoma.*

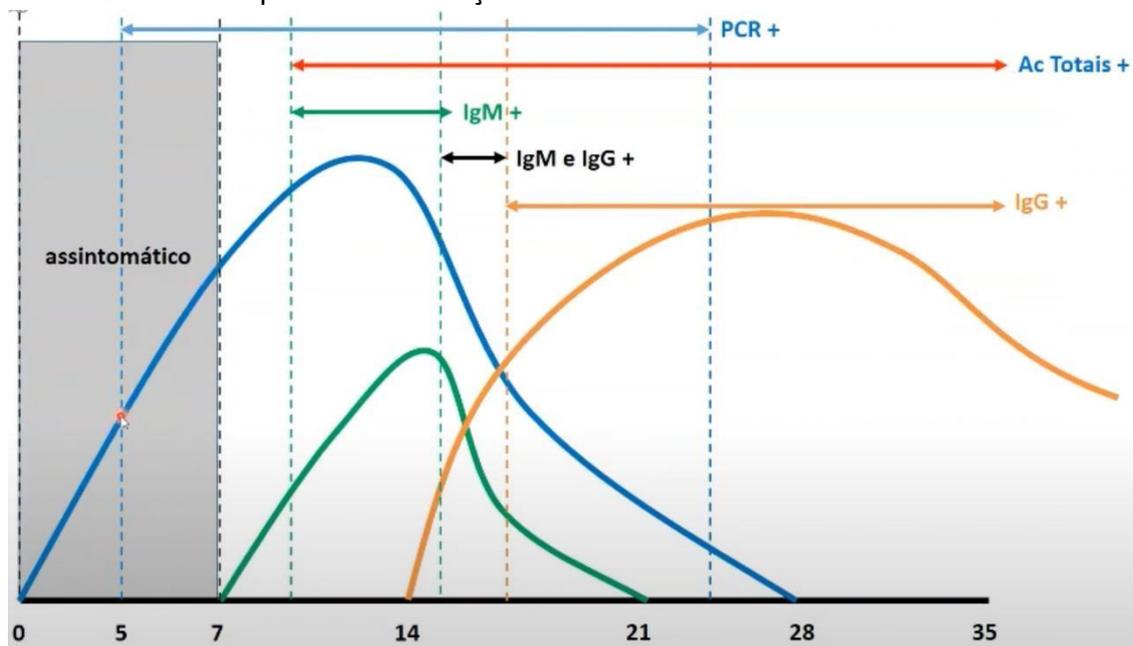
Alguns conjuntos de reagentes para testes sorológicos foram autorizados pela Anvisa em caráter emergencial devido à gravidade da situação e à necessidade de ampliar a testagem da população, mas a validação destes reagentes pelos laboratórios é fundamental, uma vez que poucos trabalhos conseguiram ser publicados até o momento.

Das bulas de conjuntos de reagentes divulgadas às quais tivemos acesso foi possível extrair a especificidade e sensibilidade dos testes que se mostram nos bulários ACIMA do que realmente o são conforme tabelas de resultados abaixo divulgadas, (veja Quadros 2 e 3).

5. Interpretação dos testes diagnósticos para CoV-2- 10 de abril de 2020

O gráfico e a tabela seguintes podem ser usados para a interpretação dos resultados dos testes para Cov2, atentando-se, evidentemente, para as causas de resultados falso positivos ou falso negativos descritos na literatura para cada um dos testes disponíveis.

Gráfico 1 – Curva esperada de detecção



O gráfico será sempre a representação das informações obtidas dos resultados estatísticos. Por exemplo; acima, nos mostra até o 7º dia o paciente assintomático (sabe-se que a maior incidência de manifestações sintomáticas ocorre do 5º ao 7º dia). Muitos pacientes serão sintomáticos em torno de 10 dias e assim por diante. Para melhor entendimento sugere-se sempre que se considere o início dos sintomas como ponto de partida para o diagnóstico em medicina laboratorial.

5.1 Testes utilizando RT-PCR

1- Ideal para coleta ao início dos sintomas. (Maior carga viral). Pelo gráfico até no máximo 13 dias após os sintomas.

Testes positivos nesta metodologia, segundo a literatura, muito raramente poderão ser falso positivos. Se não houver concordância clínica (ausência de sintomas), realize a pesquisa de anticorpos 20 dias após. Se positiva confirma COVID 19 assintomático

Testes Negativos nesta metodologia:

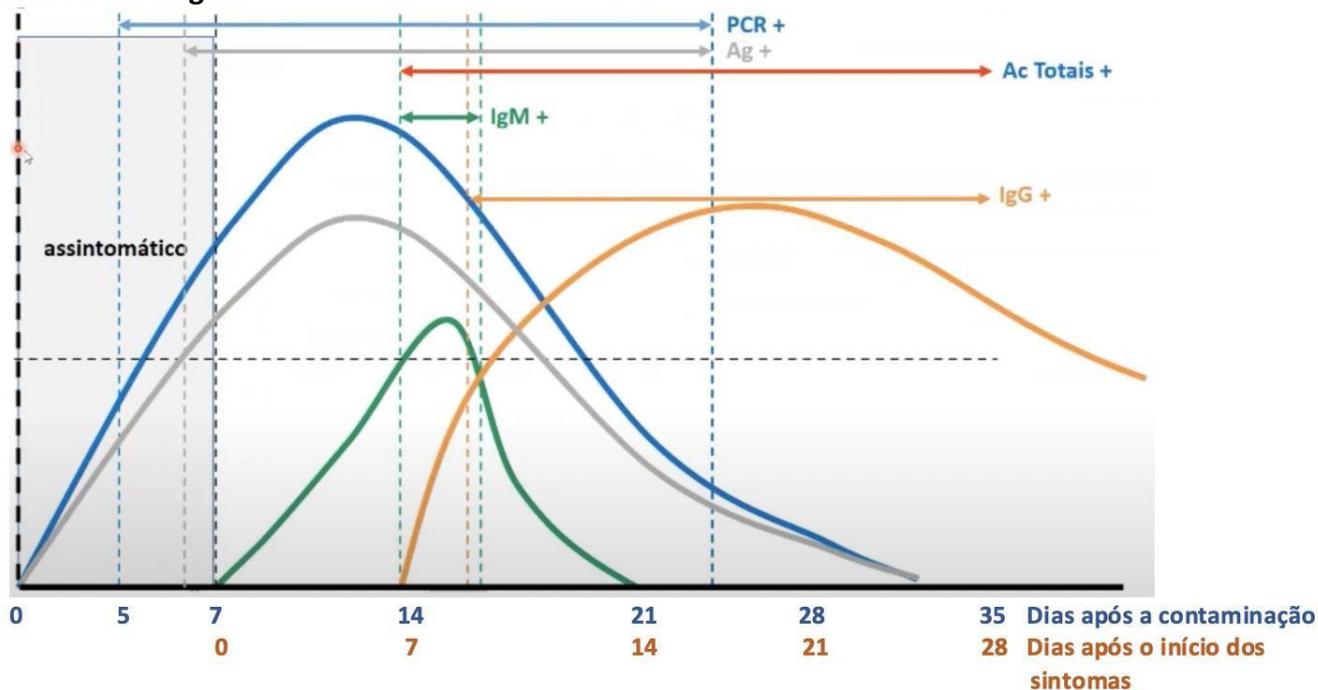
- Coleta inadequada da oro e naso faringe
- Número baixo de cópias virais no material coletado ou oscilação da carga viral. Coleta realizada no período inadequado (ver gráfico acima)

Nota técnica I. No caso do PCR-RT, o material que oferece maior sensibilidade é o lavado bronco alveolar - 93%, seguido de escarro – 72%, swab de nasofaringe – 63%, swab de orofaringe – 32%, fezes – 29% e sangue – 1% aproximadamente).

5.2 Teste para pesquisa de anticorpos IgG e IgM para o SARS-COV 2.

No gráfico acima a pesquisa de anticorpos é feita por metodologia ELISA ainda não disponível no Brasil. Esta é mais sensível que os métodos imunocromatográficos disponíveis no Brasil. E para fazer uma interpretação na nossa realidade em 09 de abril, seguimos as orientações do Professor Caio Salvino e do professor Marcos Kneip do Laboratório Fleury e apresentamos o gráfico abaixo que nos mostra a sensibilidade de detecção dos anticorpos em uma realidade diferente do gráfico anterior.

Curva esperada de detecção utilizando-se RT-PCR e pesquisa de IgG e IgM por testes imunocromatográficos



Neste gráfico observar a linha tracejada horizontal ----- que nos mostra o ponto de corte do teste em relação ao IgG e IgM (limiar de sensibilidade). Ao Lado do 1º dia do início dos sintomas, observa-se que teremos aumento detectável de IgM a partir do 7º ao 10º (2 a 3 dias) e aparecendo IgG detectável a partir do 16º dia do início dos sintomas.

5.3 Testes utilizando métodos IMUNOCROMATOGRÁFICOS RÁPIDOS

Resultados Não Reagentes – Ausência de anticorpos anti SARS COV 2

- Falsos negativos devido a janela imunológica (insuficiente tempo decorrido desde a infecção para que se detecte anticorpos. Coletas de amostras realizadas antes do sugerido (**Ideal 16º ao 20º dia após o início dos sintomas**). Pacientes imunossilenciosos, imunossuprimidos.

Resultados Reagentes – Presença de anticorpos anti SARS COV 2

- Falso positivos. Reação cruzada com outros anticorpos proveniente de outros agentes ou de doenças autoimunes, hepatopatias, dialisados, após vacinação e múltiplas transfusões de sangue.

Observações: É provável que, da mesma forma que em outras viroses, os anticorpos apareçam em níveis similares em pacientes sintomáticos e assintomáticos.

6. Quadros informativos

6.1 Quadro 1 – Probabilidade de Significado Clínico

TESTES			PROBABILIDADE DE SIGNIFICADO CLÍNICO
PCR	IgM	IgG	
+	-	-	Paciente em janela imunológica – anticorpos ainda indetectáveis ou não circulantes O resultado da IgM pode ser falso-negativo → alta probabilidade
+	+	-	Paciente pode estar no estágio inicial da infecção → doença em evolução*
+	+	+	O paciente está na fase ativa da infecção → doença em declínio**
+	-	+	O paciente em estágio tardio ou recorrente da infecção
-	+	-	O paciente pode estar no estágio inicial da infecção. O resultado da PCR pode ser falso-negativo. O resultado do IgM pode ser falso positivo
-	-	+	O paciente pode ter tido uma infecção passada e se recuperou Paciente imunizado***
-	+	+	O paciente pode estar no estágio de recuperação de uma infecção ou o resultado da PCR pode ser falso-negativo (sendo assim, doença pode estar em declínio)

*Acompanhar marcadores laboratoriais de prognósticos;

**Cuidado: Ainda há carga viral presente mesmo sem sintomas clínicos;

***Não há evidências quanto à manutenção da IgG e da imunidade, assim como possibilidade de reinfeção;

6.2 Quadro 2 – Estudo de Zhang et al.

Material: Naso Orofaringe

SENSIBILIDADE	TOTAL	1 a 7 dias após o início dos sintomas	8 a 14 dias após o início dos sintomas	15 a 39 dias após o início dos sintomas
MARCADOR				
Antígeno RNA*	67,1%	66,7%	54,0%	45,5%
Anticorpos totais **	93,0%	38,3%	89,6%	100,0%
IgM **	82,7%	28,7%	73,3%	94,3%
IgG **	64,7%	19,1%	54,1%	79,8%
RNA + Ac TOTAIS	99,4%	78,7%	97,0%	100,0%

*Método RT-PCR

**Método ELISA

6.3 Quadro 3 – Estudo de Zhang et al.

Interessante este quadro em pacientes que não se encontrou RNA VIRAL em amostra de swab nasofaringe qual foi a resposta imune com anticorpos totais, IgM e IgG.

Dias após início dos sintomas	Pacientes RNA indetectável	Ac Totais (%)	IgM (%)	IgG (%)
1 - 3	7	2 (28,6)	2 (28,6)	2 (28,6)
4 - 7	28	15 (53,6)	12 (42,9)	8 (28,6)
8 - 14	57	56 (98,2)	45 (78,9)	40 (70,2)
15 - 39	30	30 (100)	28 (93,3)	22 (73,3)

*RNA testado por método de SWAB nasofaríngeo

Comentário: Tratando-se a COVID 19 de uma doença muito recente, com muitas informações e resultados em medicina laboratorial, tendo em vista metodologias diferentes empregadas no mundo, tem-se que olhar com cuidados os gráficos de interpretação da evolução da doença e sua resposta imune. Esperamos estarmos contribuindo com este material para melhor entendimento no que temos pela frente em nossas rotinas sendo está a primeira nota técnica envolvendo o assunto. Assim que cronologicamente avançarmos por esta pandemia e novas metodologias se mostrarem disponíveis iremos divulgar e utilizar.

7. Conclusões

1. Presença de resultados falsos NEGATIVOS em todos os marcadores;
2. RT-PCR considera-se o melhor marcador no início da infecção;
3. Anticorpos totais tem bons resultados após 15^o dia do início dos sintomas;
4. IgM apresenta bons resultados entre 7^o e 10^o dia do início dos sintomas;
5. IgG apresenta bons resultados a partir do 16^o dia do início dos sintomas;

Um abraço a todos.

Atenciosamente,

Dr. Jorge Alberto Schaefer

Diretor geral – Laboratório Bom Pastor

Agradecimento a todos que colaboraram na feitura desta nota técnica, desde os professores citados, mais colegas deste imenso Brasil, aos colegas da LAS e colegas da área técnica do nosso laboratório e supervisor da área de TI.