

HERMES PARDINI

Medicina, Saúde e Bem-estar

ORIENTAÇÕES TÉCNICAS SOBRE O DIAGNÓSTICO DA COVID-19

Métodos e estratégias diagnósticas disponíveis e recomendadas com base no conhecimento científico atual e principais diretrizes mundiais

Autores

Dr. Fabiano de Almeida Brito

Dra. Melissa Bianchetti Valentini

Dra. Maria Laura Jorge Froede

Dra. Junia Dias Franco Pérez

Dr. Guilherme Birchal Collares

Caro(a) parceiro(a) do Grupo Pardini,

Os primeiros sinais do coronavírus, ainda na China, no fim do ano passado, acenderam um sinal de alerta para o Grupo Pardini. Ninguém tinha ideia do que estava por vir, da pandemia que se anunciava, mas iniciávamos os primeiros planos de contingência para o enfrentamento de um possível aumento de demanda. Nos preparamos para conseguir realizar internamente o teste de RT-PCR e reforçar nossos estoques de matéria prima para manter a nossa operação rotineira de atendimento aos nossos parceiros de todo o país.

O agravar da crise vem levando a empresa a tomar novas medidas todos os dias, de modo a garantir agilidade e acurácia de nossos testes, contribuindo para o sistema de saúde do Brasil. Estamos trabalhando 24 horas por dia, sete dias por semana, para melhor atender às demandas de nossos clientes – pacientes, médicos prescritores, laboratórios parceiros, hospitais e operadoras de saúde.

Em meio à pandemia da COVID-19, a realização de testes é um desafio. Como uma empresa referência nacional e internacional em Medicina Diagnóstica, é nossa obrigação compartilhar nossa visão técnica sobre os tipos de testes disponíveis, seus riscos e vantagens. Por isso, reunimos nosso quadro técnico para a redação desta publicação.

A seguir, compartilhamos o posicionamento técnico do Grupo Pardini com o intuito de esclarecer sobre os métodos e estratégias diagnósticas disponíveis e recomendadas com base no conhecimento científico atual e principais diretrizes mundiais.

Reiteramos nosso compromisso com a medicina diagnóstica de qualidade. Mais do que nunca, nosso propósito de levar tecnologia em saúde para quem precisa e onde estiver permanece vivo e relevante. Para nós, nossos parceiros e por toda a sociedade.

Cordialmente,

Roberto Santoro

Presidente-Executivo



Sobre a COVID-19

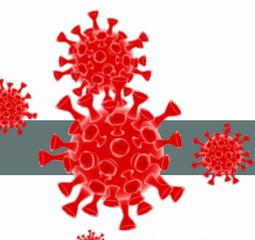
Vários coronavírus podem infectar humanos causando doenças respiratórias leves. Eventualmente, novas cepas de coronavírus podem surgir, causando quadros com altas taxas de mortalidade como Síndrome Aguda Respiratória Grave (SARS-CoV) e Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). Em dezembro de 2019, vários casos de pneumonia viral foram relatados na cidade de Wuhan na China, com a identificação de um novo betacoronavírus. A doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) é uma infecção causada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), cujo espectro clínico pode variar de infecções assintomáticas a quadros respiratórios graves.

Quais os métodos laboratoriais disponíveis para avaliação do paciente com suspeita de COVID-19?

Até o presente momento foram registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) testes baseados nos seguintes métodos:

- RT-PCR - Testes de amplificação de ácidos nucleicos para SARS-CoV-2.
- Testes sorológicos para pesquisa de anticorpos IgA, IgM e/ou IgG anti-SARS-CoV-2, pelos métodos ELISA, quimioluminescência ou imunocromatográfico.
- Teste imunocromatográfico para pesquisa de antígeno viral em amostras do trato respiratório superior.

Importante ressaltar que a solicitação concomitante de painéis de vírus respiratórios é recomendada por várias diretrizes para auxiliar no diagnóstico diferencial de COVID-19 com outras doenças respiratórias virais agudas.



Qual é o teste de escolha para o diagnóstico da COVID-19?

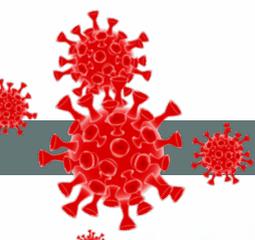
A detecção do SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) é o teste laboratorial de escolha para o diagnóstico de pacientes sintomáticos na fase aguda.

Qual o momento mais adequado para solicitar a RT-PCR?

Como a carga viral costuma ser mais alta na primeira semana da doença, o exame de RT-PCR deve ser realizado o mais precocemente possível, preferencialmente, entre o 3º e o 5º dia do início dos sintomas.

Os padrões de eliminação viral nos diferentes compartimentos do organismo humano, incluindo o pico da carga viral e duração da eliminação do vírus, ainda não são totalmente definidos.

O tempo de incubação médio do SARS-CoV-2 é de 5 dias. O período de detecção viral é variável, dependendo da origem da amostra e da gravidade da doença. A mediana de detecção do RNA viral em amostras do trato respiratório superior pode ser de até 20 dias após o início dos sintomas (intervalo de 8 a 37 dias). A detecção prolongada do vírus é mais comum nos casos mais graves.



Quais são as amostras biológicas aceitáveis para RT-PCR?

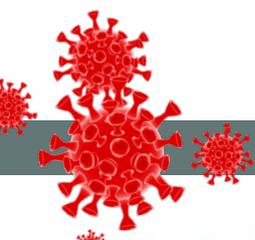
Tabela 1: Amostras para realização do teste SARS-CoV2 por RT-PCR

Amostra	Dispositivo de coleta	Transporte	Estabilidade	Comentários
Trato respiratório superior: Swab/Lavado nasofaringe Swab/Lavado orofaringe	Swab em meio de transporte VTM* ou salina estéril. Não utilizar swabs de alginato de cálcio ou algodão.	2 a 8 °C	Até 3 dias: refrigerado	Indicadas para pacientes ambulatoriais. Swab de nasofaringe é a amostra de preferência. Swab de orofaringe é aceitável quando não for possível coletar outras amostras.
Trato respiratório inferior: Escarro Aspirado traqueal Lavado broncoalveolar	Frasco estéril	2 a 8 °C	Até 3 dias: refrigerado	Aspirado traqueal e lavado broncoalveolar são indicados para pacientes graves. O escarro não deve ser induzido.

* Abreviação: VTM, *viral transport media*.

Como solicitar o exame da RT-PCR para diagnóstico da COVID-19?

- **Descrever o tipo de amostra (material):** swab/lavado de nasofaringe e/ou orofaringe, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal ou escarro.
- **Descrever a data** de início dos sintomas e a data da coleta da amostra.
- **Descrever o exame:** RT-PCR para SARS-CoV-2.



Um único resultado de SARS-CoV-2 não detectado na RT-PCR exclui COVID-19?

Várias publicações têm descrito casos de pacientes com COVID-19 e RT-PCR com SARS-CoV-2 não detectado. Existem muitos fatores que podem levar a um resultado falso-negativo da RT-PCR, como ilustrado na tabela 2.

Tabela 2: Causas de resultados falsos-negativos na RT-PCR

Fatores pré-analíticos	Fatores analíticos	Fatores biológicos
Coleta inadequada, contendo pouco material do paciente. Conservação e transporte inadequado da amostra.	Mutação viral ou presença de inibidores de PCR na amostra. Baixa carga viral, abaixo do limite de detecção do teste. Falha na execução do teste.	Tipo de amostra: Sensibilidade de amostras do trato respiratório inferior > nasofaringe > orofaringe. Amostras coletadas precocemente ou tardiamente durante a evolução da doença. Flutuação da carga viral.

Wang e colaboradores demonstraram, em estudo com 1070 amostras de 205 pacientes com COVID-19, maior sensibilidade de amostras do trato respiratório inferior: lavado broncoalveolar 93%, escarro 72%, swab de nasofaringe 63%, swab de orofaringe 32%, fezes 29%, sangue 1% e urina 0%.

Um estudo publicado com uma série de casos demonstrou que a carga viral de pacientes nos quais foram realizadas múltiplas coletas de swab de orofaringe e nasofaringe flutuou ao longo do tempo. Um mesmo paciente pode apresentar o vírus detectado na amostra coletada em um dia e não detectado em amostra coletada em outro dia.

Li e colaboradores descreveram que 12,5% de pacientes hospitalizados com COVID-19 e RT-PCR inicialmente negativa em swab de orofaringe converteram a positivo em coletas subsequentes realizadas com dois a quatro dias de intervalo entre elas, alguns na 4ª coleta.



Portanto, um único resultado não detectado, principalmente se for de amostra do trato respiratório superior, não exclui COVID-19.

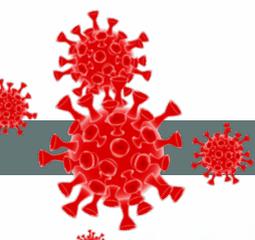
Recomenda-se, havendo disponibilidade do teste, a coleta de nova amostra, se possível do trato respiratório inferior, em caso de doença grave ou progressiva, ou na presença de dados clínico-epidemiológicos fortemente sugestivos de COVID-19, quando a primeira amostra é negativa.

Quais as causas e conduta frente a um resultado indeterminado da RT-PCR?

Dependendo do protocolo utilizado, a reação de RT-PCR pesquisa dois ou três alvos genéticos do SARS-CoV-2. O resultado é liberado como detectado quando dois ou mais genes são amplificados.

Quando apenas um gene é amplificado, o resultado é liberado como indeterminado. Carga viral baixa, coleta inadequada, degradação do RNA viral, mutação do vírus e/ou coleta precoce ou tardia são fatores associados a resultados indeterminados.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que, em áreas com transmissão comunitária do SARS-CoV-2, a detecção de apenas um gene é suficiente para que o resultado da RT-PCR seja reportado como detectado. No entanto, levando-se em consideração a heterogeneidade epidemiológica da COVID-19 no país, e com o objetivo de minimizar a possibilidade de resultados falsos-positivos, o Hermes Pardini optou por manter a liberação de resultados indeterminados na RT-PCR, que devem ser correlacionados ao quadro clínico e epidemiológico do paciente, e orientando a repetição do exame a critério médico.

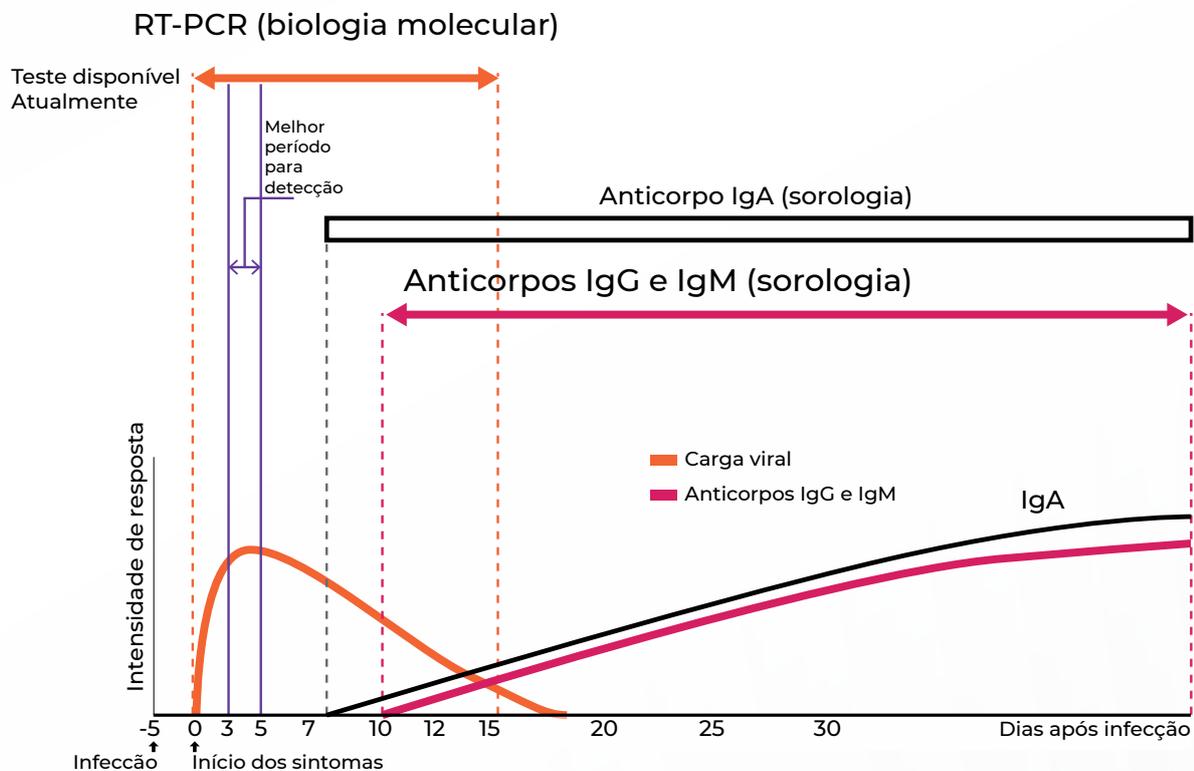


Resposta imune

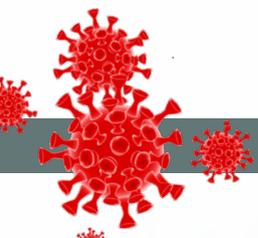
Anticorpos das classes IgA, IgM e IgG dirigidos contra proteínas estruturais do SARS-CoV-2 são produzidos pelo organismo após a infecção. No entanto, a frequência de positividade para esses anticorpos é tempo-dependente. Menos de 50% dos pacientes com COVID-19 apresentam anticorpos detectáveis no soro antes de 7 a 10 dias após o início dos sintomas. Um estudo descreveu que, em alguns pacientes, a soroconversão de IgM ou IgG ocorreu após 20 a 23 dias do início dos sintomas.

O tempo de persistência das imunoglobulinas IgA e IgM ainda não está estabelecido. Estudos de análise sorológica longitudinal de pacientes com SARS-CoV 1 evidenciaram a presença destas imunoglobulinas por um período de 180 dias. Serão necessários estudos longitudinais para que possamos verificar qual será o comportamento das imunoglobulinas nos pacientes com COVID-19.

Figura: Evolução da carga viral e da resposta imunológica ao SARS-CoV-2



* Adaptado de Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection
insenescent BALB/c Mice:CD4+T cells are important in control of SARD-CoV infection



Limitações da sorologia para COVID-19

Resultados falsos-negativos: podem ser observados principalmente, mas não exclusivamente, quando realizada nos primeiros 7 a 10 dias após o início dos sintomas.

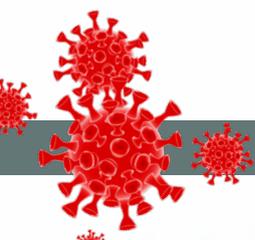
Resultados falsos-positivos/reações cruzadas: podem ocorrer com outros coronavírus que causam infecções humanas (SARS-CoV-1 e HCoV-OC43), e em infecções causadas pelo citomegalovírus (CMV) e vírus Epstein-Baar (EBV).

A presença de anticorpo IgA ou IgM reagente ou indeterminado isoladamente deve ser interpretada com critério, uma vez que estes anticorpos apresentam menor especificidade. Sugere-se repetição da sorologia após 14 dias, para avaliação de soroconversão de anticorpo IgG.

Ausência de padronização dos kits: os diferentes antígenos e métodos utilizados para a detecção dos anticorpos, bem como o desenho dos estudos de avaliação do desempenho diagnóstico dos testes, resultam em heterogeneidade nos valores de sensibilidade, especificidade, e na cinética do aparecimento dos anticorpos descritos na literatura.

Os testes baseados nos métodos ELISA e quimioluminescência (realizados dentro de ambiente laboratorial por técnicas automatizadas) apresentam desempenho analítico superior aos testes imunocromatográficos (rápidos).

Avaliação de imunidade: até o presente momento, não há comprovação de que o surgimento de anticorpos IgG após a infecção esteja associado com o desenvolvimento de imunidade e interrupção da transmissão do SARS-CoV-2.



Quando realizar a sorologia?

A sorologia deve ser realizada prioritariamente:

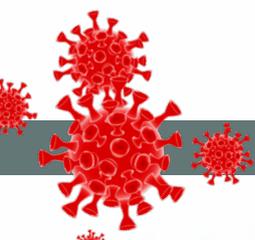
- Avaliação de retorno ao trabalho para profissionais de saúde com suspeita de COVID-19, a partir do sétimo dia de sintomas. Neste contexto, um resultado não-reagente não descarta a infecção, sendo necessário realizar RT-PCR.
- Pacientes com quadros respiratórios graves e suspeita de COVID-19, com sete ou mais dias de sintomas, quando o resultado do exame de RT-PCR ainda não está disponível. Neste contexto, um resultado não-reagente não descarta a infecção.
- Estudos epidemiológicos referentes ao percentual de pessoas expostas na população e que já desenvolveram anticorpos.

Como solicitar a sorologia para SARS-CoV-2?

Sorologia para COVID-19 (Anticorpos anti-SARS-CoV-2)

A realização combinada de dois testes, um para detecção de anticorpo associado com resposta imunológica precoce (IgA ou IgM) e outro para detecção de IgG em pacientes com suspeita da COVID-19 após o 7º e até o 20º dia após início de sintomas, aumenta a sensibilidade do exame. Devido à associação entre vários fatores técnicos e biológicos, como a fase evolutiva da infecção, kit utilizado e a resposta imune individual, alguns pacientes com COVID-19 apresentarão dois isotipos de anticorpos reagentes ou apenas um deles no momento da realização da sorologia. Devido a menor especificidade do IgA/IgM em relação ao IgG, soroconversão de IgG deve ser demonstrada em nova amostra coletada 7 a 14 dias após um resultado IgA indeterminado ou reagente isolado para excluir falso-positivo.

Sorologia para COVID-19 (Anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2)



A realização de IgG isolada é recomendada em pacientes com início dos sintomas há mais de 20 dias ou para inquéritos epidemiológicos devido a alta sensibilidade e melhor especificidade.

Como interpretar os resultados sorológicos?

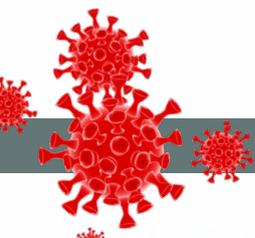
Resultado reagente: contato com SARS-CoV-2. A detecção de anticorpos não necessariamente significa que o vírus é o agente etiológico do quadro respiratório atual. É imprescindível que o resultado seja interpretado por um médico, no contexto dos dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos do paciente.

Resultado não-reagente: pode representar (1) falso-negativo, seja analítico (o paciente possui anticorpos em concentração abaixo do limite de detecção do kit) ou biológico (a amostra foi coletada precocemente, antes do desenvolvimento de anticorpos contra o vírus) ou (2) infecção por outro microrganismo respiratório. Repetição da sorologia em nova amostra, RT-PCR para SARS-CoV-2 ou painel para detecção de múltiplos microrganismos em amostras respiratórias devem ser solicitados, de acordo com a disponibilidade dos exames e julgamento médico.

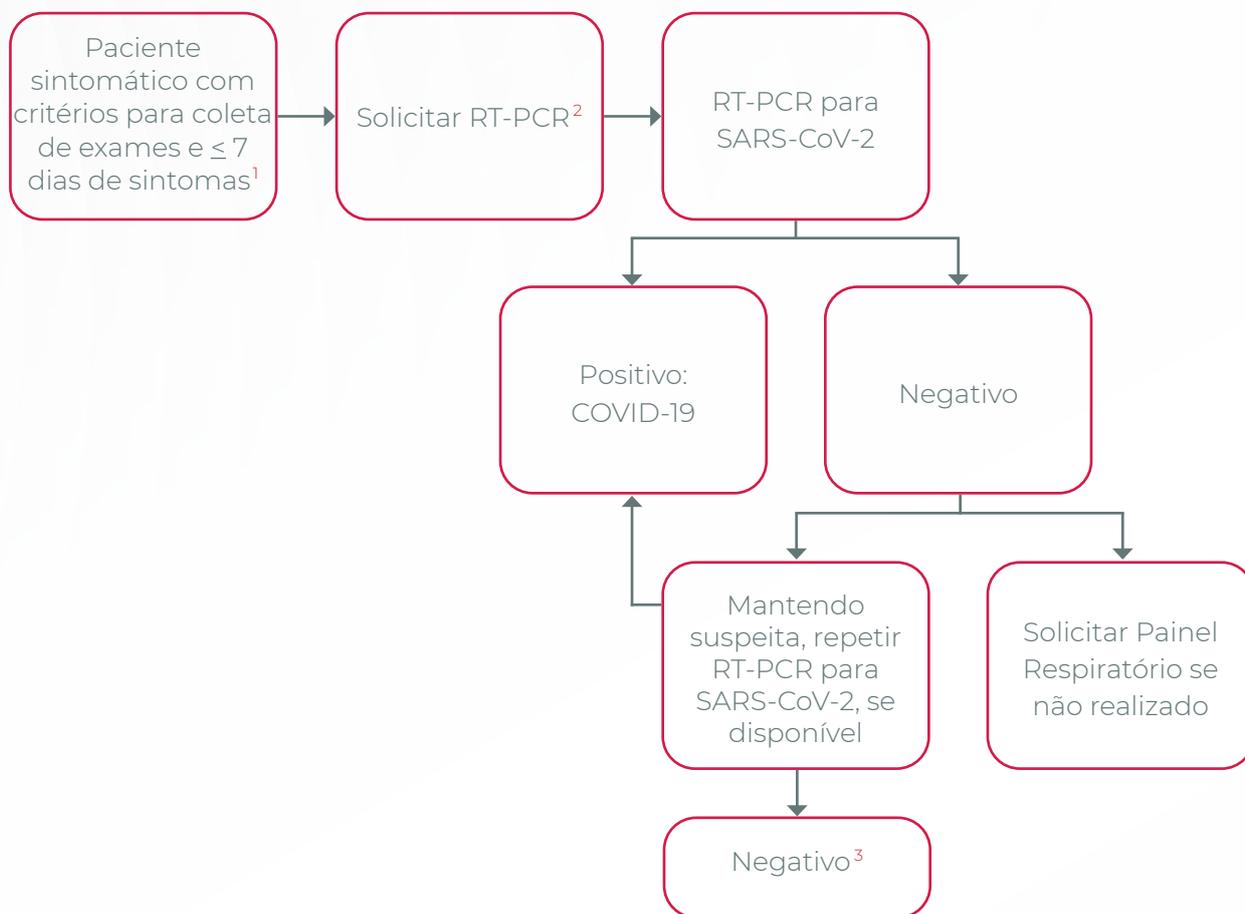
Algoritmos diagnósticos

Com base em informações científicas e diretrizes publicadas até o momento, seguem abaixo 3 algoritmos diagnósticos para infecção por COVID-19.

1. Avaliação diagnóstica do paciente com suspeita de COVID-19 com até 7 dias de sintomas
2. Avaliação sorológica do paciente sintomático grave com suspeita de COVID-19 com mais de 7 dias de sintomas
3. Avaliação sorológica do profissional de saúde com suspeita de COVID-19



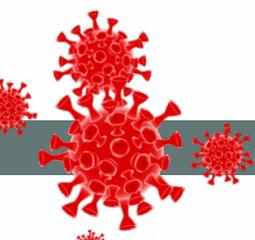
Algoritmo 1: Avaliação diagnóstica do paciente com suspeita de COVID-19 com até 7 dias de sintomas, baseado nas informações científicas e diretrizes publicadas até o momento.



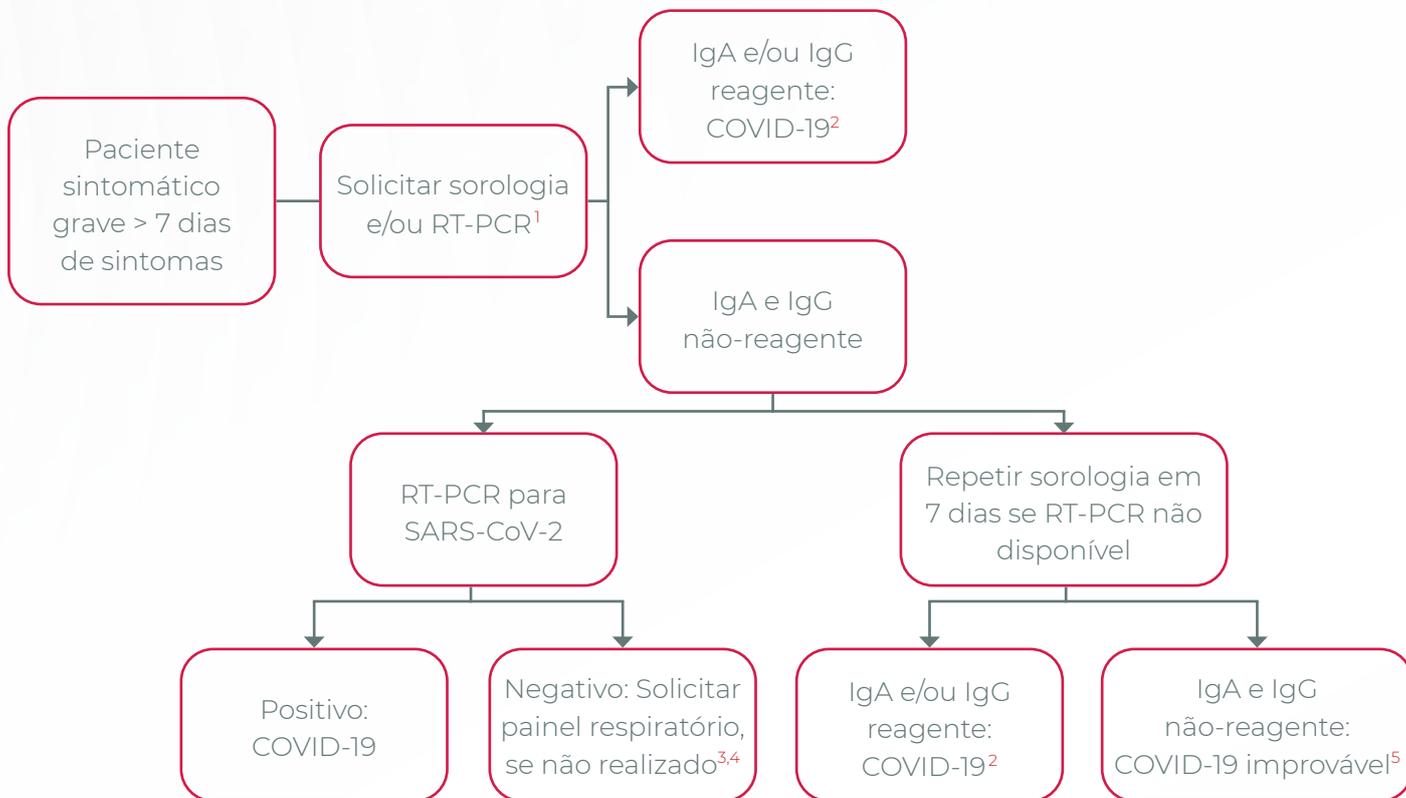
1. Os critérios para realização da RT-PCR podem variar de acordo com os protocolos dos diferentes órgãos de saúde e sociedades médicas federais, estaduais ou municipais, hospitais e laboratórios. Pacientes internados, com síndrome respiratória aguda grave (síndrome gripal com dispneia ou saturação de O₂ < 95% ou desconforto respiratório), profissionais de saúde sintomáticos e pacientes com síndrome gripal e comorbidades são frequentemente citados como grupos prioritários.

2. RT-PCR para SARS-CoV-2 e painel respiratório.

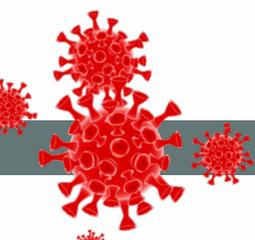
3. Avaliar quadro clínico, epidemiológico e correlacionar com demais exames laboratoriais e de imagem. Avaliar realizar sorologia após o 7º dia de sintomas se persistir suspeita de COVID-19 e painel respiratório negativo.



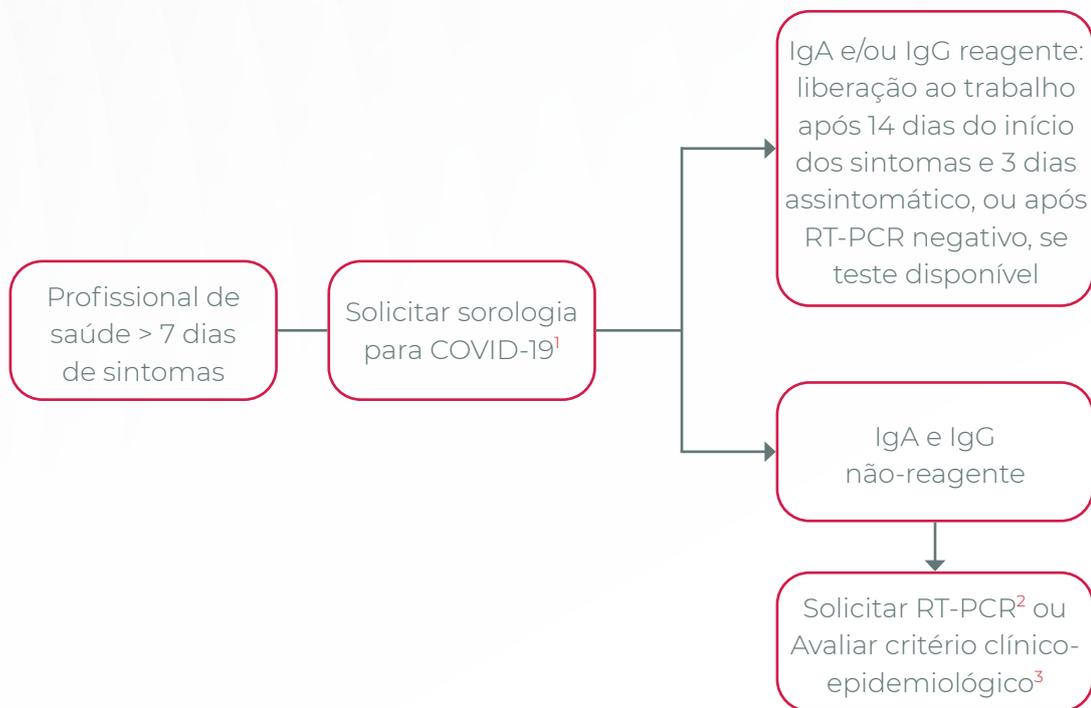
Algoritmo 2: Avaliação sorológica do paciente sintomático grave com suspeita de COVID-19, com mais de 7 dias do início dos sintomas, baseado nas informações científicas e diretrizes publicadas até o momento.



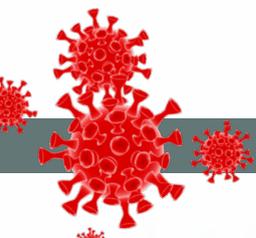
1. RT-PCR para SARS-CoV-2 e painel respiratório. A escolha por RT-PCR e/ou sorologia deve depender da disponibilidade dos testes.
2. Deve ser interpretado por um médico, em conjunto com demais dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos do paciente.
3. Painel respiratório: geralmente teste de PCR em tempo real multiplex realizado em amostras do trato respiratório, com detecção de múltiplos vírus.
4. Pacientes com COVID-19 e RT-PCR negativo e sorologia reagente para SARS-CoV-2, com RT-PCR positivo em exame subsequente, foram descritos, indicando resultado falso-negativo da RT-PCR inicial. Nestas situações, sugere-se repetir a RT-PCR. RT-PCR persistentemente negativa com sorologia reagente pode indicar resultado falso-positivo da sorologia ou contato prévio com o SARS-CoV-2.
5. Raros pacientes com COVID-19 podem apresentar resultado de sorologia não-reagente para SARS-CoV-2, mesmo após 21 dias do início dos sintomas.



Algoritmo 3: Avaliação sorológica do profissional de saúde com suspeita de COVID-19, baseado nas informações científicas e diretrizes publicadas até o momento.



1. Se início de sintomas há mais de 20 dias, sugere-se realização apenas de sorologia IgG, devido à melhor especificidade e sensibilidade próxima a 100%.
2. SARS CoV-2 não detectado na RT-PCR, avaliar descontinuação de precauções empíricas de transmissão.
3. Pode retornar ao trabalho profissionais que não realizaram RT-PCR, desde que preencham os seguintes critérios: pelo menos 3 dias afebril, sem uso de antitérmicos, e melhora dos sintomas respiratórios; e pelo menos 14 dias desde o início dos sintomas.



Referências bibliográficas

- Métodos Laboratoriais para Diagnóstico da Infecção pelo SARS-CoV-2. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (<http://www.sbpc.org.br/wp-content/uploads/2020/04/MetodosLaboratoriaisDiagnosticoSARS-CoV-2.pdf>). Acessado em 09/04/2020.
- World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance, 19 March 2020.
- Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel, Instructions for Use. 15/03/2020.
- Wang W, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA. 2020 Mar 11. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
- Zou L, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. N Engl J Med. 2020 Mar 19;382(12):1177-1179.
- Li Y, et al. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. J Med Virol. 2020 Mar 26. doi: 10.1002/jmv.25786.
- Guo L, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). Clin Infect Dis. 2020 Mar 21. pii: ciaa310. doi: 10.1093/cid/ciaa310. [Epub ahead of print]
- Nisreen M.A. Okba, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medRxiv 2020.03.18.20038059; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038059>
- Quan-xin Long, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. medRxiv 2020.03.18.20038018; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038018>.
- Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA), de 01/04/2020 - RCPA advises against COVID-19 IgG/IgM rapid tests for the detection of early COVID disease.
- <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/return-to-work.html>
- <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/guidance-risk-assesment-hcp.html>
- Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection insenescent BALB/c Mice:CD4+T cells are important in control of SARD-CoV infection.



Autores

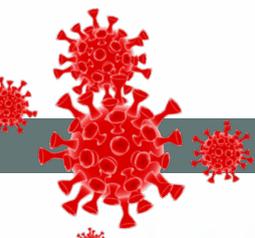
Dr. Fabiano de Almeida Brito – médico patologista clínico e reumatologista, professor adjunto da Faculdade de Medicina da UFMG, doutor em patologia, assessor científico do Grupo Pardini

Dra. Melissa Bianchetti Valentini – Médica infectologista e mestre em infectologia e medicina tropical, assessora científica do Grupo Pardini

Dra. Maria Laura Jorge Froede – médica patologista clínica, gerente corporativa de pós-analítico do Grupo Pardini

Dra. Junia Dias Franco Pérez - médica patologista clínica, gerente executiva de produção do Grupo Pardini

Dr. Guilherme Birchal Collares - médico patologista clínico, mestre em microbiologia pela UFMG, diretor de operações do Grupo Pardini



HERMES PARDINI

Medicina, Saúde e Bem-estar

Para mais informações, entre em contato:

  (31) **3228.6200** | portalmedicopardini.com.br