

Aspectos laboratoriais na abordagem da COVID-19

Quem testar? Quando testar? Qual amostra testar?

Quando repetir um teste? Como interpretar os resultados?

1. Introdução

Em janeiro de 2020, foi identificada na China uma nova cepa de coronavírus, formalmente designada coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), causadora da doença denominada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como COVID-19. No momento, estamos com uma pandemia em curso e vamos apoiar com informação e prevenção. É certo que, atualizações científicas são disponibilizadas com frequência por se tratar de um agente infeccioso novo e uma nova patologia, ficando este informativo sujeito a revisões.

Ao mesmo tempo em que há um número crescente de opções comerciais para o diagnóstico laboratorial do SARSCoV-2, existe um grande desafio por parte dos laboratórios na melhor adequação ao uso pretendido, dependendo de seu design, qualidade e aplicação no contexto epidemiológico do nosso país, somado à escassez de recursos.

2. Investigação laboratorial de infecção respiratória associada ao SARS-CoV-2

A recomendação oficial das sociedades científicas permanece sendo a reação da polimerase em cadeia com transcrição reversa em tempo real (rRT-PCR) realizada em amostras clínicas respiratórias de trato superior ou inferior. No entanto, deve-se considerar que, não importa o quão preciso seja o método de teste em laboratório, o diagnóstico das pneumonias virais, como as causadas pelo SARS-CoV-2, envolve a coleta da amostra correta, qualitativamente adequada, no momento certo, para melhorar a sensibilidade de detecção.

Os tipos de amostras incluem: amostras das vias aéreas superiores (zaragatoas faríngeas, zaragatoas nasais, secreções nasofaríngeas), amostras das vias aéreas inferiores (escarro, secreção das vias aéreas, líquido de lavagem broncoalveolar), sangue, fezes, urina e secreções conjuntivais. As amostras mais frequentemente coletadas e mais facilmente acessíveis são os swabs, com a recomendação do Ministério da Saúde de coletar *swab* combinado nasal/oral. Segundo artigo do periódico *New England*, as maiores taxas de positividade foram encontradas em lavado broncoalveolar (93%), seguida de escarro (72%), swabs nasais (63%), biópsia

fibrobronoscópica (46%), swabs faríngeos (32%), fezes (29%) e sangue (1%).

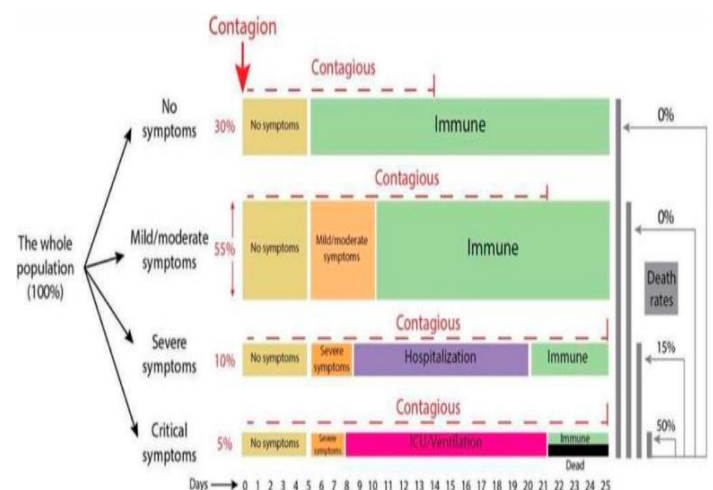
3. Sobre o vírus

A estrutura do SARS-CoV-2; consiste em uma proteína *spike* que inclui duas regiões, S1 e S2, onde S1 é para ligação ao receptor da célula hospedeira e S2 é para fusão da membrana. A proteína *spike* é um alvo típico para neutralizar com anticorpos e vacinas. Foi relatado que o SARS-CoV-2 pode infectar as células epiteliais respiratórias humanas 100-1000 vezes mais que as cepas anteriores de coronavírus e o faz interagindo com os receptores humanos ACE2. A proteína N do nucleocapsídeo é a proteína mais abundante na SARS-CoV-2. A proteína N é uma fosfoproteína altamente imunogênica, raramente sofre mutação e é frequentemente usada como marcador em ensaios de diagnóstico. Há também o dímero de hemaglutinina-esterase, uma glicoproteína de membrana, uma proteína do envelope e RNA.

4. Período de Incubação e dinâmica da infecção

O período exato de incubação não é conhecido. Presume-se que esteja entre 2 a 14 dias após a exposição, com a maioria dos casos ocorrendo dentro de 5 dias.

Chama atenção no diagrama abaixo, a prolongada contágiosidade, porém há baixa letalidade, exceto em pacientes críticos.



References:

1. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. Lauer SA et al. *Ann Intern Med.* 2020 Mar 10.
2. Impact of non-pharmaceutical interventions (NPIs) to reduce COVID-19 mortality and healthcare demand. Neil M Ferguson et al. Imperial College COVID-19 Response Team. 16 March 2020.
3. Viral dynamics in mild and severe cases of Covid-19. Yang Liu et al. *The Lancet.* March 19, 2020.

LABORATÓRIO

Rua XV de Novembro, 190, Centro, Taubaté – (12)3621-2331 (12)99778-6844
Horário de atendimento: segunda a sexta-feira de 07:00 às 18:00 e aos sábados de 07:00 às 12:00
www.proexame.com.br
lab@proexame.com.br

PRÓ-EXAME

Uma publicação do:

LabRede®

WWW.LABREDE.COM.BR

5. Utilização dos testes de detecção do ácido nucleico (PCR em tempo real- RT-PCR)

Os testes moleculares, apesar da demora nos resultados, dependendo do método, são os mais indicados para o diagnóstico, pois são o padrão ouro. Existem plataformas analíticas totalmente automatizadas e outras abertas (manuais, *in house*). Possuem uma alta sensibilidade e especificidade, dependendo do *design* do ensaio.

A maior parte dos testes de rRT-PCR disponíveis é baseada nos protocolos do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta e do Hospital Universitário Charité, Berlin.

Em várias regiões do Brasil, devido à escassez de recursos, no momento, sua indicação tem sido direcionada, prioritariamente, aos pacientes hospitalizados.

PCR- RT- Indicações primordiais

- Pacientes sintomáticos que necessitem internação, devido aos critérios clínicos e laboratoriais
- Profissional de saúde sintomático para definição de afastamento do trabalho
- Indivíduos com quadros moderados de síndrome gripal e pessoas em isolamento
- Óbitos suspeitos
- Surtos em locais fechados (asilos, prisões, etc..)

A carga viral, em média, pode ser detectada por metodologias moleculares entre 0 a 12 dias de sintomas, podendo chegar a mais de quatro semanas em alguns casos.

Um único resultado não detectado, não exclui infecção por COVID-19, e deve ser correlacionado com dados clínicos e epidemiológicos.

Quando um teste é negativo e há sintomas sugestivos, cabe considerar também a utilização de **painéis de testes para outros vírus respiratórios**. Os painéis de vírus respiratórios são testes de imunofluorescência direta ou reação da polimerase em cadeia (PCR) multiplex que detectam na mesma amostra de material do trato respiratório antígenos ou material genético de várias bactérias e vírus.

6. Ensaio baseado em pesquisa de antígenos

Existem no mercado, produtos destinados a pesquisa de proteínas virais específicas que podem ser detectadas por diferentes testes (por exemplo ELISA, imunofluorescência).

São testes que podem ser utilizados, juntamente com a definição do caso, a história clínica e a história epidemiológica, para diagnosticar e tomar decisões em saúde pública, do tipo isolamento e rastreamento de casos.

Importante ressaltar que a pesquisa de antígenos do vírus SARS-CoV-2 pode ser realizada do primeiro ao quinto dia da infecção, porém um resultado negativo, em qualquer estágio, não descarta a COVID-19. Isto porque a dinâmica da produção destas partículas virais ainda não está completamente estabelecida.

7. Ensaio para detecção de anticorpos

Os estudos publicados sugerem que a maioria dos pacientes faz soroconversão entre 7 e 11 dias após a exposição ao vírus, embora alguns pacientes possam desenvolver anticorpos mais cedo. Como resultado desse processo natural tardio, o teste de anticorpos não é útil no cenário de uma doença aguda. Embora, no momento atual de pandemia, sejam úteis os testes bem indicados (tempo) que detectam IgM e IgG.

Testes sorológicos versus PCR: Os testes que detectam anticorpos IgM / IgG e IgA para SARS-CoV-2, estão no mercado em diferentes opções (testes rápidos e ELISA). Os testes rápidos são de imunocromatografia, podendo ser utilizados em amostras de sangue total, soro ou plasma.

Devido ao grande número de marcas no mercado, muitos testes têm sido considerados pouco sensíveis e muito sujeitos a falhas. No entanto, segundo levantamento produzido pelo Núcleo de Avaliação de Tecnologias em Saúde do Hospital Sírio-Libanês (NATS-HSL), os testes sorológicos, incluindo os testes rápidos, parecem apresentar boa sensibilidade e especificidade, quando aplicados alguns dias após o início dos sintomas. Dois estudos avaliaram esta comparação (Li 2020, Guo 2020). No estudo multicêntrico conduzido por Li e colaboradores, a acurácia diagnóstica do teste sorológico para detecção de IgM e IgG, de forma combinada, por imunoenensaio de fluxo lateral foi avaliada (Li 2020). O teste referência utilizado foi o PCR (sangue) e foram incluídos participantes com doença clínica confirmada (n = 397) e sem a doença (n = 128). A sensibilidade do teste sorológico foi de 88,6% e a especificidade de 90,6%.

Embora a aplicação prioritária destes testes não seja o diagnóstico, muitas vantagens podem ser obtidas com a sua ampla utilização, como já definido nas publicações científicas:

- ✦ Rastreamento de contatos, assim como os testes baseados em RNA.
- ✦ Vigilância sorológica nos níveis local, regional, estadual e nacional.
- ✦ Identificação daqueles que já tiveram o vírus e, portanto, podem (se houver imunidade protetora) ter se tornado imunes. Supondo que exista imunidade protetora, sorológica, as informações podem ser usadas para orientar decisões de retorno ao trabalho, especialmente os profissionais de saúde.
- ✦ Identificação de indivíduos que podem ser uma fonte de anticorpos neutralizantes terapêuticos ou profiláticos (atualmente experimentais).
- ✦ Auxílio no cálculo das estatísticas, incluindo a taxa de mortalidade de casos.

No entanto, os protocolos atualmente sugeridos se baseiam na aplicação dos testes sorológicos tendo como fundamento o apoio ao uso racional dos ensaios moleculares. A premissa básica é que os testes sorológicos possuem alto Valor Preditivo Positivo (VPP), diante de casos suspeitos podem confirmar, porém não são úteis nos casos negativos, pois não podem descartar a infecção.

São algumas **limitações** dos testes:

- ✦ Possível reatividade cruzada com outros coronavírus (ainda não estabelecidos) que normalmente estão presentes na população, tornando difícil a interpretação de resultados.
- ✦ Utilização nos primeiros 7 dias do início dos sintomas pois, em estudos publicados, nesta fase menos de 40% dos pacientes

. A carga viral, em média, pode ser detectada por metodologias moleculares entre 0 a 12 dias de sintomas. Casos de detecção prolongada tem sido observado, especialmente em situações de maior gravidade.

Durante o acompanhamento, a IgM pode ser detectável 10 dias após o início dos sintomas e a IgG em até 12 dias após o início dos sintomas. Portanto, resultados negativos com alta suspeição após 14 dias de sintomas, poderiam ser repetidos confirmados em outras metodologias.

Indicações dos testes sorológicos, com uso racional do PCR

- Pacientes após 7 dias de evolução que possuem um resultado de RT-PCR negativo e elevada suspeição diagnóstica. Segundo a OMS, amostras pareadas na fase

aguda e convalescente poderiam apoiar o diagnóstico realizando teste molecular e sorológico.

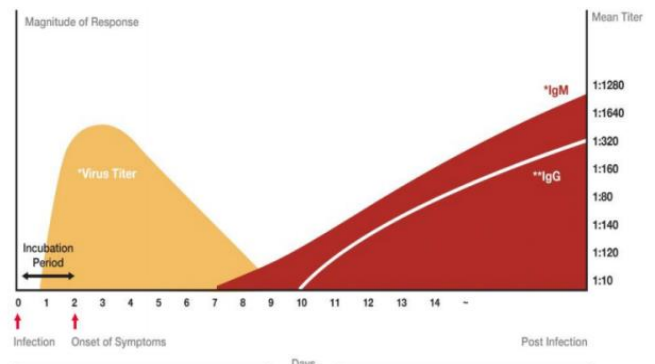
- No manejo hospitalar dos pacientes que estão com pelo menos 7 dias de sintomas moderados ou graves e com sorologia positiva.
- Nos profissionais de saúde afastados com suspeita de COVID-19, para triagem e retorno às atividades profissionais, se assintomáticos. Se persistir negativa, recomenda-se fazer o PCR.
- Pacientes sintomáticos (pelo menos 7 dias) sem critérios de internação hospitalar, tendo o diagnóstico de COVID-19 através da sorologia positiva, sem uso de RT-PCR.
- Apoio diagnóstico e epidemiológico a surtos em pacientes institucionalizados.

Os testes que após o 7º dia identificam apenas anticorpos totais, indicam somente o contato prévio com o vírus, mas não confirmam a presença da doença aguda. Portanto, os anticorpos detectados podem resultar de uma infecção pregressa e não para a qual o diagnóstico está sendo necessário, ou seja, reatividade cruzada com outros coronavírus, ainda não estabelecida, dificultando a interpretação dos resultados.

Lembrar que nos primeiros 7 dias após o início dos sintomas, menos de 40% dos pacientes apresentam anticorpos detectáveis. Dessa maneira, estes ensaios não devem ser usados para descartar casos nos primeiros dias de doença.

É fundamental levar em conta o **impacto dos resultados falso negativos** nas diferentes metodologias, que são: a falha na assistência ou atraso no suporte aos indivíduos infectados, suas famílias e contatos, bem como o maior risco associado de disseminação do COVID-19 na comunidade ou outros efeitos adversos não intencionais.

Abaixo um diagrama para auxiliar na utilização dos testes:



The timing and level of antibodies is uncertain after SARS-CoV-2 infection, and varies between patient populations. This graphic depicts one scenario based on the limited published evidence.

Retirado de documento do *Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA)*, de 01/04/2020

8- Achados laboratoriais - Hemograma

- **Contagem global de leucócitos:** A contagem de glóbulos brancos pode variar. Ele não fornece informações precisas sobre COVID-19.
- Leucopenia, leucocitose e linfopenia foram relatadas.
- A linfopenia é mais comum, vista em mais de 80% dos pacientes.
- **Trombocitopenia** leve é comum. No entanto, a trombocitopenia é considerada também como um sinal de mau prognóstico.

9- Marcadores de Inflamação

Recomenda-se realizar de testes de proteína C reativa, procalcitonina, ferritina, Dímero D, tipagem de linfócitos, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ e outros indicadores de inflamação e estado imunológico, que podem ajudar a avaliar o progresso, alertar tendências para deterioração do quadro clínico e formular estratégias de tratamento.

- **Procalcitonina sérica:** A procalcitonina sérica geralmente é normal no momento da admissão; no entanto, aumenta em pacientes que necessitam de cuidados na UTI. Segundo dados de Huang, os pacientes terão procalcitonina normal e PCR muito elevada.
- **Proteína reativa (PCR):** O aumento da PCR na COVID-19 parece acompanhar a gravidade e o prognóstico da doença. Deve-se considerar a presença de infecções associadas. Segundo alguns autores, nos doentes com insuficiência respiratória grave, com um nível normal de PCR deve-se sempre procurar um diagnóstico alternativo.

Alguns achados laboratoriais que **signalizam um agravamento do quadro clínico e/ou pior prognóstico** são:

- ✧ **D-Dímero muito elevado.**
- ✧ **Linfopenia no início da doença.** Pacientes graves apresentam uma diminuição progressiva do número de linfócitos do sangue periférico.

Elevação dos níveis de interleucinas: Os níveis de IL-6 e IL-10 são elevados, mas o monitoramento da progressão é útil para avaliar o risco de evoluir para uma condição grave.

Referências

1. Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., & Tan, W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA. Published online March 11, 2020. doi:10.1001/jama.2020.3786
2. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. M Bio. March/April 2020;11(2) e00722-20. Disponível em <https://mbio.asm.org/content/11/2/e00722-20>. Acesso em 01/04/2020
3. Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. N Engl J Med 2020; 382(13):1199-1207
4. Lou B, Li TD, Zheng SF, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset - medRxiv preprint Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.23.20041707v1.full.pdf>. Acesso em 01/04/2020
5. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory Diagnosis of Emerging Human Coronavirus Infections — The State of the Art, Emerging - Emerging Microbes & Infections 2020;9(1):747-756.
6. Joseph K, Moslehi MA. International Pulmonologist's Consensus On Covid-19. Disponível em: <https://www.unah.edu.hk/dmsdocument/9674-consenso-internacional-de-neumologos-sobre-covid-19-version-ingles>. Acesso em 01/04/2020
7. Yu, L (2020) Handbook of COVID-19 Prevention and Treatment. Disponível em: https://www.epi.gov.et/images/novel_coronavirus/Handbook-of-COVID-19-Prevention-and-Treatment.pdf. Acesso em 01/04/2020.
8. Organização Mundial da Saúde. (2020). Testes de laboratório para a doença de coronavírus 2019 (COVID-19) em suspeitos de casos humanos: orientação interina, 2 de março de 2020. Organização Mundial da Saúde. Disponível em <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329OPAS>: Acesso em 01/04/2020
9. PAHO / Organização Mundial da Saúde (2020) Diretrizes de laboratório para a detecção e diagnóstico da infecção por vírus COVID-19. Disponível em <https://www.paho.org/en/documents/laboratory-guidelines-detection-and-diagnosis-covid-19-virus-infection>. Acesso em 01/04/2020.
10. Estratégias laboratoriais para identificação da infecção pelo novo coronavírus. Depto. De Propedêutica Complementar- Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Disponível em: <https://www.medicina.ufmg.br/coronavirus/wp-content/uploads/sites/91/2020/04/Estrat%C3%A9gias-laboratoriais-para-identifica%C3%A7%C3%A3o-da-infec%C3%A7%C3%A3o-pelo-novo-coronav%C3%ADrus.pdf>. Acesso em 07/04/2020.

Assessoria Médica Lab Rede