

Recomendações técnicas sobre a utilização dos testes diagnósticos para SARS-CoV-2 Critérios para retestagem laboratorial diante de resultados divergentes de COVID-19

CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS – COE/MS

Assunto: Recomendações técnicas sobre a utilização dos testes diagnósticos para SARS-CoV-2 (COVID-19) e para retestagem laboratorial diante de resultados divergentes de COVID-19.

Os exames oferecidos comercialmente hoje no Brasil para Covid-19 se dividem em dois grupos distintos. O primeiro são os chamados testes moleculares, que detectam a presença direta do vírus no organismo. O principal é o chamado teste RT-PCR ou PCR em tempo real, que usa amostras colhidas das vias respiratórias do paciente com auxílio de swab, uma espécie de cotonete. É um exame apurado e preciso, mas que também exige estrutura física e tecnológica específica, além de reagentes importados, o que gerou limitações de expansão no momento em que havia uma corrida mundial pela compra desses insumos de testagem laboratorial.

Com a disseminação dos casos no Brasil, e considerando que o PCR não seria aplicado em massa por causa de sua complexidade, custos da tecnologia, tempo de execução e necessidade de insumos específicos, abriu-se espaço para outro grupo de testes, os chamados testes sorológicos ou de detecção de anticorpos. Os testes sorológicos ou exames sorológicos são um exame de sangue obtido por meio de coleta venosa no qual o laboratório de análises clínicas analisa se o paciente teve contato com o novo coronavírus de modo indireto, não pela detecção do vírus, mas pela detecção da presença de anticorpos produzidos pelo organismo a partir do contato ou exposição prévia ao vírus SARS-Cov-2.

É um método mais barato e acessível, embora considerado de menor sensibilidade e especificidade. Entram também nesse grupo os chamados testes rápidos. A análise de anticorpos é feita com amostra de sangue total obtida por punção digital (perfuração da ponta do dedo) ou através de soro ou plasma obtido por punção venosa. São testes de rápida execução, pois os resultados são obtidos em 15 minutos. A principal desvantagem é que são mais imprecisos e possuem limitações de janela imunológica: a quantidade de falsos negativos é maior em comparação aos testes moleculares e aos sorológicos convencionais, exigindo profissionais treinados para a interpretação dos resultados. A amostra deve ser coletada em tempo adequado ou oportuno, após 10 dias da infecção ou após 08 dias dos sintomas iniciais. O período médio de janela imunológica é 7-10 dias. Após 30 dias da infecção, espera-se que 100% dos pacientes possuam anticorpos totais ou IgG detectáveis.

Os testes de diagnóstico para COVID-19 se destacaram na pandemia de coronavírus em andamento como uma ferramenta essencial para rastrear a propagação da doença. Uma ampla gama de testes diagnósticos está disponível comercialmente para o Coronavírus 2 (SARS-CoV-2), alguns dos quais receberam autorizações para uso por várias agências reguladoras nacionais. Com as informações da sequência genética identificadas, testes de diagnóstico baseados na detecção da sequência viral por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) ou plataformas de sequenciamento logo se tornaram disponíveis. Isso permitiu a confirmação do diagnóstico e melhores estimativas da atividade da infecção, que vêm

aumentando em velocidades alarmantes. Para a detecção mais sensível de SARS-CoV-2, recomendavam-se a coleta e o teste de amostras respiratórias superiores e inferiores, a realização de testes sorológicos rápidos (imunocromatográficos) e/ou testes sorológicos convencionais com acurácia superior. O diagnóstico de casos suspeitos pode ser confirmado por testes de RNA com RT-PCR a partir do swab nasal e/ou de faringe. O padrão-ouro para diagnóstico laboratorial da COVID-19 é a reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para amostras coletadas no trato respiratório superior ou inferior. Dados de epidemia de SARS-CoV-2 mostram que as respostas sorológicas, incluindo imunoglobulina M viral (IgM) e imunoglobulina G viral (IgG) podem permitir o diagnóstico sorológico a partir de diferentes testes.

A produção de anticorpos do hospedeiro para um vírus específico durante uma infecção de fase aguda é consistente na maioria dos pacientes, exceto naqueles com imunodeficiência. Após a infecção humana por Coronavírus 2 SARS-CoV-2, seu antígeno estimula o sistema imunológico a produzir uma resposta imunológica e os anticorpos correspondentes são detectados no sangue de pacientes sintomáticos e assintomáticos. Entre eles, o SARS-CoV-2 IgM aparece ligeiramente mais cedo que SARS-CoV-2 IgG, podendo ser detectado sua presença após 3 a 5 dias do início dos sintomas. Em seguida, as titulações do anticorpo SARS-CoV-2 IgM diminuem e a produção do anticorpo SARS-CoV-2 IgG aumenta rapidamente. A titulação deste anticorpo durante a fase de recuperação pode aumentar 4 vezes ou mais em comparação com a fase aguda.

- Anticorpos contra os antígenos do SARS-CoV-2 IgG, IgM e IgA e totais podem ser detectados em sangue total, soro ou plasma por testes convencionais (ensaios imunoenzimáticos ou quimioluminescência) ou testes rápidos imunocromatográficos.

- A acurácia dos testes sorológicos varia por metodologia, antígeno empregado e momento da coleta (idealmente após 10º dia para IgM IgA e anticorpos totais e, após 15º dia, para IgG).

- Reações cruzadas são descritas com outros coronavírus, Zika, Dengue e Fator Reumatóide. Há pouca evidência de reação cruzada com anticorpos vacinais.

- Testes sorológicos para SARS-CoV-2 podem ser usados como exame complementar para diagnóstico de infecção prévia ou recente por COVID-19 especialmente quando a infecção viral está em via aérea baixa e o RT-PCR pode ser negativo em secreção de oronasofaringe.

- Testes sorológicos para SARS-CoV-2 também podem ser indicados para estudos populacionais, porém deve-se ter atenção quanto à validação e acurácia dos testes utilizados, bem como seleção da amostra e interpretação de resultados.

- Testes sorológicos para SARS-CoV-2 não estão indicados para pré-operatório de cirurgia eletiva e também não devem ser utilizados na identificação e controle de surtos entre profissionais de saúde, por não indicarem período de infectividade ou transmissibilidade da doença.

- Testes sorológicos não devem ser utilizados isoladamente para indicar ou retirar o paciente das precauções respiratórias. Os critérios para retirada do paciente com doença confirmada por COVID-19 das precauções respiratórias, quando indicado, devem incluir análise de sintomas e/ou teste de RT-PCR para SARS-CoV-2.

TESTES LABORATORIAIS USADOS NO DIAGNÓSTICO DE COVID-19:

1. PT-PCR

O teste RT-PCR (do inglês *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*), é considerado o padrão-ouro no diagnóstico da COVID-19, cuja confirmação é obtida através da detecção do RNA do SARS-CoV-2 na amostra analisada, preferencialmente obtida de raspado de nasofaringe. O PCR é um teste específico com capacidade de detecção do RNA viral, possibilitando a detecção do vírus entre 2 a 5 dias após a infecção, quando ocorre replicação viral significativa dentro das células do paciente infectado.

O teste tem resultados confiáveis nas amostras coletadas entre 3 a 7 dias do início dos sintomas, sendo o 5º dia considerado ideal para essa metodologia de teste. O teste PT/PCR pode fornecer dois resultados:

a) Detectado (Positivo): indica que o paciente está infectado pelo vírus SARS-CoV-2 em seu organismo, significa que o vírus está presente e se replicando em suas vias respiratórias superiores. Indica infecção recente.

b) Não Detectado (Negativo): indica que o paciente não possui o vírus SARS-CoV-2 em atividade em suas vias respiratórias ou a quantidade de vírus no momento está abaixo do limiar suficiente de detecção do teste.

Limitações do teste: o exame detecta a presença de RNA-viral na amostra. Antes de 03 dias do surgimento dos primeiros sintomas, o vírus não se replicou em quantidades suficientes ou detectáveis e poderá estar abaixo do limiar de detecção. Depois de 07 dias a maioria dos pacientes não possui vírus em atividade nas vias respiratórias superiores (mucosa nasal) devido à produção de anticorpos. Dessa forma, o tempo ideal ou oportuno para realização do PT-PCR está entre o 3º dia até o 7º dia de manifestação de sintomas. Portanto, amostras coletadas antes do 3º dia e após o 7º dia poderão exibir resultados falso-negativos, embora a pessoa esteja infectada pelo vírus e possa transmiti-lo comunitariamente. Após o 7º dia, o teste PT-PCR não está mais indicado e o diagnóstico laboratorial se dará através de testes sorológicos rápidos (imunocromatográficos) ou testes sorológicos convencionais de pesquisa de anticorpos IgM/IgG dirigidos contra o vírus SARS-CoV-2, de sensibilidade e acurácia superior como Quimioluminescência ou Elisa.

2. TESTES SOROLÓGICOS DE DETECÇÃO DE IgM/IgG:

Testes Rápidos (ensaios imunocromatográficos) e Testes Sorológicos Convencionais (quimioluminescência, elisaimunoensaio e outros)

A sorologia, diferentemente da RT-PCR, verifica a resposta imunológica do corpo em relação ao vírus. Isso é feito a partir da detecção de anticorpos IgA, IgM e IgG em pessoas que foram expostas ao SARS-CoV-2. Nesse caso, o exame é realizado a partir da amostra de sangue do paciente. Para que o teste tenha maior sensibilidade, é recomendado que seja realizado, após o 8º dia do início dos sintomas. Isso se deve ao fato de que produção de anticorpos no organismo só ocorre depois de um período mínimo após a exposição ao vírus. Realizar o teste de sorologia fora do período indicado pode resultar num resultado falso negativo. Por isso. Em caso de resultado negativo, uma nova coleta pode ser necessária.

É importante ressaltar, ainda, que nem todas as pessoas que têm infecção por SARS-CoV-2 desenvolvem anticorpos detectáveis pelas metodologias disponíveis, principalmente imunodeprimidas e aquelas que apresentam quadros com sintomas leves ou assintomáticos.

Testes Rápidos (ensaios imunocromatográficos):

Os Testes Sorológicos Rápidos (TR) são empregados para a detecção de anticorpos contra o vírus SARS-COV-2, o teste somente terá utilidade se a amostra utilizada possuir título suficiente de anticorpos IgM ou IgG para que ocorra a detecção.

A recomendação é que sejam utilizadas amostras colhidas após 10 dias da infecção/contágio ou após 08 dias dos sintomas iniciais, tempo necessário para que a detecção dos anticorpos ocorra com maior sensibilidade e precisão.

1. A sensibilidade dos TR variam conforme o fabricante. O TR fornecido pelo Ministério da Saúde (ONE STEP COVID-2019 TEST) possui sensibilidade de 86,4%, especificidade de 99,6% e taxa de coincidência de 91,6%. Esses dados demonstram que os resultados do TR e os resultados clinicamente confirmados eram em sua maioria consistentes. A taxa de detecção do paciente confirmado em estágio inicial foi de 83,2%.
2. Testes rápidos (TR) são aqueles cuja execução, leitura e interpretação dos resultados são feitas em, no máximo, 30 minutos. Além disso, são de fácil execução e não necessitam de estrutura laboratorial.
3. A execução dos TR, habitualmente, é muito simples e a capacitação de pessoal pode ser realizada presencialmente ou por meio de ensino à distância (EAD) com cuidado de observar as orientações contidas nas instruções de uso de cada marca e fabricante.
4. TR são recomendados para testagens presenciais, podendo ser executados com amostra de sangue total obtida por punção venosa ou da polpa digital.
5. Dependendo do fabricante, os TR podem ser realizados com amostras de sangue, soro, plasma ou saliva (fluido gengival), há evidências da superioridade de amostras de soro/plasma obtidas por centrifugação sobre amostras de sangue total obtidas por coleta por punção digital.
6. Está indicado o TR para amostras de pacientes com 10 dias da infecção ou após 08 dias do surgimento dos sintomas iniciais para que a detecção dos anticorpos ocorra, pois há riscos de resultado falso negativo em amostras de pacientes cujos sintomas clínicos surgiram antes de 10 (dez) dias, mesmo estando infectados (PCR positivo para SARS-CoV-2).

Como já foi dito, o PCR é um teste específico, considerado padrão ouro para detecção precoce do RNA viral, possibilitando a detecção do vírus entre 3 a 5 dias após a infecção, quando ocorre replicação viral significativa dentro das células do paciente. Por outro lado, os anticorpos demandam maior tempo para serem produzidos, o sistema imune demanda tempo para reconhecer o vírus e para iniciar a resposta imunológica específica que se inicia com a produção de IgM e produção subsequente de IgG, em título detectáveis.

Importante frisar que a produção de anticorpos vai variar de indivíduo para indivíduo e vai depender das condições clínicas, do sistema imune e da resposta imunológica individual de cada paciente.

RESULTADOS DOS TESTES RAPIDOS:

<ul style="list-style-type: none"> • REAGENTE ou POSITIVO: Duas linhas são visíveis, sendo uma linha na região controle (C) e outra na região teste (T). A intensidade de cor da linha teste (T) poderá variar de acordo com a concentração dos anticorpos presentes na amostra. Todavia, qualquer intensidade de cor na linha teste indica resultado positivo. Indica um resultado reagente para os anticorpos SARS-CoV-2 na amostra.
<ul style="list-style-type: none"> • NÃO REAGENTE ou NEGATIVO: Apenas uma linha é visível na região controle (C), não sendo observada linha na região teste. Indica que a concentração dos anticorpos SARS-CoV-2 é zero ou abaixo do limiar de detecção (faixa de cut-off). Pode ser realizado a retestagem do paciente no 14º dia do surgimento dos sintomas.
<ul style="list-style-type: none"> • INVÁLIDO: Não é evidenciada a linha controle (C). Nenhuma faixa colorida visível aparece na linha de controle (C) após a realização do teste. As instruções podem não ter sido seguidas corretamente ou o teste pode ter se deteriorado. Recomenda-se repetir a análise da amostra. As razões mais comuns de falha são o volume insuficiente de amostra ou falha no procedimento técnico.

DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA CORONAVIRUS 2 (SARS-CoV-2):

<p>Detecção de Imunoglobulina SARS-COV-2 IgM</p>
<p>Quando o teste exibe resultado positivo para IgM indica infecção recente ao vírus SARS-COV-2, significa que teve exposição recente ao vírus e que tem o vírus ativo em seu organismo, com alto risco de transmissão comunitária.</p>
<p>Resultados negativos podem indicar falso-negativo, pois o paciente está infectado, mas pode estar em janela imunológica quando ainda não produziu títulos de anticorpos em níveis detectáveis. Havendo sintomatologia ou suspeita de infecção, recomenda-se que o teste seja repetido após sete dias ou no 14º dia do surgimento dos sintomas.</p>
<p>Detecção de Imunoglobulina SARS-COV-2 IgG</p>
<p>Quando o teste exibe resultado positivo para IgG indica que teve exposição prévia ou passada ao vírus SARS-COV-2, significa que tem ou teve o vírus ativo em seu organismo e não significa necessariamente que possui imunidade à doença. Significa que pode ter tido uma infecção passada e se recuperou ou está em processo de recuperação.</p>
<p>Resultados negativos podem indicar falso-negativo, pois o paciente está infectado, mas pode estar em janela imunológica quando ainda não produziu títulos de anticorpos IgG em níveis detectáveis. Havendo sintomatologia ou suspeita de infecção, recomenda-se que o teste seja repetido após sete dias ou no 14º dia do surgimento dos sintomas.</p>
<p>Não Reagente (negativo) para as duas Imunoglobulinas (IgM e IgG)</p>
<p>Pode significar que o paciente nunca teve contato ou nunca foi exposto ao vírus SARS-COV-2 e que não está infectado, principalmente se o mesmo estiver assintomático. Resultados negativos podem indicar falso-negativo, pois o paciente pode ter sido testado em período inadequado e está em janela imunológica, quando ainda não produziu títulos de anticorpos em níveis detectáveis. Havendo sintomatologia ou suspeita de infecção, recomenda-se que o teste seja repetido no 14º dia do surgimento dos sintomas.</p>

CUIDADOS ESPECIAIS NA CONSERVAÇÃO E USO DOS TESTES RÁPIDOS

1. Medidas biossegurança e EPI's apropriados devem ser utilizados durante a coleta, armazenamento, manuseio e descarte da amostra.
2. Não utilizar kit com data de validade expirada.
3. Não utilizar o cassete de teste se a embalagem estiver perfurada, aberta ou violada.
4. Não misturar componentes (solução tampão e cassete de teste) de kits com lotes diferentes. Os números dos lotes devem ser idênticos ou coincidentes.
5. O produto deve ser armazenado na temperatura recomendada pelo fabricante, mantendo sob refrigeração ou em temperatura ambiente inferior a 30°C.
6. Não armazenar em temperaturas elevadas e nunca manter o produto exposto ao calor ou à luz solar.
7. Se o produto for refrigerado, o cassete deve ser estabilizado em temperatura ambiente antes de utilizado. Neste caso, deve-se aguardar pelo menos 30 (trinta) minutos para que o cassete alcance a temperatura ambiente, antes da realização do teste.

RETESTAGEM DIANTE DE RESULTADOS DIVERGENTES:

O diagnóstico de Covid-19 não deve ser feito por uma avaliação isolada dos resultados dos testes rápidos. No estágio inicial da infecção, falsos negativos são esperados, em razão da ausência ou de baixos níveis dos anticorpos e dos antígenos de Sars-CoV-2 na amostra. E o resultado do teste positivo indica a presença de anticorpos contra o Sars-CoV-2, o que significa que houve exposição ao vírus, não sendo possível definir apenas pelo resultado do teste se há ou não infecção ativa no momento da testagem.

O teste rápido é qualitativo e destina-se a triagem e auxílio diagnóstico. Devem ser utilizadas amostras após 10 dias da infecção ou 07 dias após os sintomas iniciais para que ocorra detecção dos anticorpos. Pode ocorrer resultado Falso Negativo em amostras cujos sintomas clínicos surgiram em um período inferior a 10 (dez) dias, mesmo com resultado PCR (+) para SARS-CoV-2.

Resultados negativos não excluem a infecção por SARS-CoV2 e resultados positivos não podem ser usados como evidência absoluta de infecção por SARS-CoV-2. O resultado deve ser interpretado por um médico com auxílio dos dados clínicos e outros exames laboratoriais, podendo ocorrer retestagem do paciente no 14º dia do surgimento dos sintomas.

Visando aumentar a sensibilidade e acurácia dos TR, recomenda-se a utilização de amostras de soro ou plasma, obtidas por centrifugação do sangue total coletado por punção venosa. Recomenda-se que os casos de resultados divergentes que envolvam suspeitas de problemas ou desvios de qualidade ou de performance dos testes, sejam notificados individualmente à Anvisa através do sistema oficial de notificação NOTIVISA disponível no link <https://www8.anvisa.gov.br/notivisa/frmLogin.asp>.

RESULTADOS DIVERGENTES – CASO 01:

Diante de resultados laboratoriais divergentes de um mesmo tipo de teste ou mesma metodologia, recomenda-se a realização de novo teste laboratorial de mesma metodologia ou de sensibilidade ou acurácia superior.

RESULTADOS DIVERGENTES – CASO 02:

Diante de resultados divergentes de dois testes rápidos de marcas diferentes (ensaio imunocromatográfico), recomenda-se a retestagem do paciente no 14º dia do surgimento dos sintomas ou no 14º dia de exposição a caso confirmado (em assintomáticos) com a realização de um teste de mesma metodologia (um terceiro teste rápido) ou a realização de novo teste de metodologia mais sensível ou de acurácia superior como os testes sorológicos convencionais realizados em laboratório, como por exemplo, Ensaio por método de Quimioluminescência ou Elisa.

RESULTADOS DIVERGENTES – CASO 03:

Diante de resultados divergentes entre um TR (de qualquer marca, realizado na rede pública ou privada) com um teste sorológico convencional de detecção de anticorpos IgM ou IgG por metodologia ou sensibilidade superior, executado em laboratório e com amostra colhida após o 7º dia de sintomas, este resultado deve prevalecer em relação ao resultado obtido pelo TR, podendo ocorrer em todo caso, retestagem do paciente no 14º dia do surgimento dos sintomas ou 14º dia de exposição a caso confirmado.

Tabela 1. Interpretação prática dos exames moleculares e sorológicos com sintomas relacionados e significado

Sintomas	RT-PCR	IgM/IgA	IgG	Interpretação
sim	-	-	-	Considerar outros diagnósticos (sugere-se diagnóstico diferencial com outras viroses respiratórias, como influenza, a depender do tempo de sintomas), falso negativo ou janela imunológica
sim	+	-	-	Doença ativa, transmissão provável
sim	+	+	-	Doença ativa, transmissão provável
sim	+	+	+	Doença ativa, transmissão provável
sim	+	-	+	Doença ativa, transmissão provável
não	+	-	-	Infecção assintomática, transmissão possível
não	+	+	-	Infecção assintomática, transmissão possível
não	+	-	+	Infecção assintomática, transmissão possível (baixa probabilidade)
não	+	+	+	Infecção assintomática, transmissão possível (baixa probabilidade)
não	-	+	+	Infecção assintomática prévia, não transmitindo
não	-	+	-	Provável falso-positivo, não transmitindo, sugerido repetir sorologia em 14 dias e/ou RT-PCR
não	-	-	+	Infecção prévia, não transmitindo
não	-	-	-	Nunca teve infecção ou contato prévio, susceptível

Legenda: - negativo; + positivo.

Fonte: Testes Sorológicos para COVID-19: Interpretação e Aplicações Práticas. Artigo de Revisão para Journal of Infection Control. Suplemento COVID – ABIH.

RECOMENDAÇÕES PARA QUE LAUDOS E RESULTADOS FORNECIDOS CONTENHAM OS SEGUINTE DADOS:

- Nome do kit diagnóstico, Nº do lote, Nº do registro na Anvisa; Nome e CNPJ do importador nacional ou fabricante;
- Data de início dos sintomas;
- Descrição dos sintomas;
- Data de execução do teste;
- Resultado do teste rápido: REAGENTE ou NÃO REAGENTE;
- Orientações ou aconselhamento profissional;
- Frases de alerta:
 - “ESTE PROCEDIMENTO NÃO TEM FINALIDADE DE DIAGNÓSTICO E NÃO SUBSTITUI A CONSULTA MÉDICA OU A REALIZAÇÃO DE EXAMES LABORATORIAIS ADICIONAIS”;
 - “TESTES RÁPIDOS NÃO DEVEM SER UTILIZADOS PARA DESCARTAR UM CASO SUSPEITO QUANDO A TESTAGEM OCORRE ANTES DO 8º DIA DO SURGIMENTO DOS SINTOMAS”;
 - “UM RESULTADO NEGATIVO DO TESTE RÁPIDO ISOLADAMENTE NÃO É SUFICIENTE PARA SE ABANDONAR MEDIDAS DE ISOLAMENTO OU DISTANCIAMENTO SOCIAL, ABANDONAR O USO DE MÁSCARAS E DEMAIS CONDUTAS DE PRECAUÇÃO DEVIDO ÀS LIMITAÇÕES DOS TESTES RÁPIDOS DISPONÍVEIS NO BRASIL”.