

## PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS PARA SARS-CoV-2

### 1. Introdução

Este protocolo é uma ação conjunta entre a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (**SBPC/ML**), a Câmara Brasileira de Diagnóstico Laboratorial (**CBDL**), a Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (**SBAC**) e a Associação Brasileira de Medicina Diagnóstica (**ABRAMED**). Tal ação surgiu em virtude da pandemia de COVID-19 iniciada em Wuhan na China.

#### 1.1 Objetivos:

- 1.1.1. Avaliação de Kits de Diagnóstico para SARS-CoV-2 disponibilizados ao mercado brasileiro;
- 1.1.2. Compartilhar e publicar os resultados periodicamente para que sirvam de referência aos setores público e privado;
- 1.1.3. Gerar dados para publicações futuras de estudos sobre convergência regulatória, acesso, “preparedness” para futuras epidemias, dentre outros temas.

#### 1.2 Requisitos mínimos dos laboratórios participantes

Os laboratórios participantes devem concordar e devem cumprir os seguintes requisitos:

- a- Ter acesso direto ao material coletado e capacidade de mantê-lo nas condições adequadas
- b- Ter laboratório próprio, inclusive com atuação hospitalar
- c- Ter em seu corpo clínico profissionais com experiência e nível acadêmico de Mestrado ou Doutorado.

- d- Ter sistema que permita o acompanhamento e rastreamento dos pacientes do ponto de vista clínico e laboratorial.

## 2. **Escopo:**

Estudo de validação para testes laboratoriais relacionados ao diagnóstico, acompanhamento e prognóstico do SARS-CoV-2 e COVID-19. Prevemos validações de:

1. **TESTES LABORATORIAIS REMOTOS** ou **TESTES SOROLÓGICOS AUTOMATIZADOS** para identificação de anticorpos IgA, IgM e IgG.
2. **TESTES LABORATORIAIS REMOTOS** ou **TESTES SOROLÓGICOS AUTOMATIZADOS** para identificação de anticorpos totais
3. **TESTES LABORATORIAIS REMOTOS** ou **TESTES SOROLÓGICOS AUTOMATIZADOS** para identificação de antígenos.
4. **TESTES LABORATORIAIS** para identificação de SARS-CoV-2 por diferentes tecnologias. Inclui-se aqui também os testes remotos.

## 3. **Tipo de amostra:**

Em geral, temos as seguintes possibilidades: sangue capilar, soro ou plasma sendo que o anticoagulante recomendado é o previsto pelo fabricante (EDTA, heparina ou citrato de sódio).

A amostra deve ser separada soro/plasma do sangue o mais rápido possível a fim de evitar a hemólise.

Amostras de material de natorofaringe, secreção brônquica e lavado bronco alveolar deverão ser colhidas em swab fornecido pelo fabricante ou outra forma, conforme orientação do mesmo. As amostras colhidas devem ser acondicionadas, transportadas e armazenadas conforme instrução de bula.

Os materiais diversos dos citados acima (urina, fezes, etc.) serão tratados conforme especificação.

As amostras utilizadas serão aquelas que já passaram por análise e seriam descartadas no processo habitual de análise laboratorial, ou ainda aquelas que passam a ser armazenadas pelos laboratórios executantes a título de soroteca.

Tais amostras são anonimizadas de dados pessoais dos doadores e seus dados de origem não serão armazenados pelo projeto, exceto aqueles dados clínicos necessárias às análises estatísticas.

#### 4. **Estabilidade das amostras:**

Em geral:

- a. O teste deve ser realizado em até 8 horas após a amostra ser coletada.
- b. Não deixe a amostra em temperatura ambiente por período prolongado.
- c. As amostras geralmente podem ser armazenadas de 2-8°C por até 3 dias.
- d. Durante longos períodos de armazenamento, as amostras devem ser mantidas abaixo de -20 ° C por até 9 dias ou a – 70% por 6 meses.

*Lembramos que a estabilidade pode variar de acordo com a instrução do fabricante, devendo, portanto, descrever neste item a estabilidade de acordo com o fabricante.*

#### 5. **Estudos a serem realizados:**

*Os seguintes estudos a serem realizados nos novos kits diagnósticos para COVID-19.*

##### 5.1 **Premissas iniciais:**

- a. **Amostras negativas:** considerar amostras, preferencialmente coletadas até **dezembro/2019** (onde o coronavírus ainda não havia se instalado no Brasil). Preferencialmente amostras sabidamente negativas para HIV, hepatite B e C.

Testes complementares devem ser incluídos para se testar reação cruzada com amostras positivas para Mononucleose e baixa avides, alta atipia e baixa atipia, amostras positivas para Dengue e Herpes.

- b. **Amostras positivas:** considerar amostras de pacientes com diagnóstico de COVID-19 por RT-PCR, coletadas nos seguintes intervalos de tempo após o início dos sintomas:

b.1) para amostras de testes sorológicos

Entre 7 e 14 dias;

Entre 15 e 21 dias;

Após 21 dias.

b.2) para testes de antígenos

Até 5 dias

- c. Importante registrar o tempo de início dos sintomas (ou internação) e tempo entre o primeiro diagnóstico RT-PCR e a coleta para o teste rápido ou por outro método.
- d. Os kits sorológicos (CMIA, ELISA, etc.) só devem ser utilizados sob realização dos controles recomendados pelo fabricante em cada rotina.
- e. Para garantir a confiabilidade da cadeia de custódia do teste rápido, para cada lote/remessa deve ser realizado controle positivo e negativo e sempre que for realizada uma bateria de testes de amostras de pacientes.
- f. Recomendamos que para cada período apontado no item 5.1.b.1 sejam avaliadas ao menos **20 amostras**.
- g. Os valores dos cut-offs a serem adotados devem ser obrigatoriamente os que são apontados pelo fabricante na bula dos kits

## 5.2 Estudo de desempenho

Deverão ser calculados, pela planilha anexa, os seguintes dados:

- a. *Sensibilidade:* reativos no ensaio/total de positivos confirmados (RT-PCR)

- b. *Especificidade*: total de não-reativos no ensaio / total de negativos confirmados
- c. *VPP (valor preditivo positivo)*: verdadeiros positivos / total de positivos
- d. *VPN (valor preditivo negativo)*: verdadeiros negativos / total de negativos
- e. *Acurácia*: (verdadeiros positivos + verdadeiros negativos) / total de amostras
- f. *RVP (razão de verossimilhança positivo)*: sensibilidade / (1 - especificidade)
- g. *RVN (razão de verossimilhança negativo)*: (1-sensibilidade) / especificidade
- h. *RPD (razão de probabilidade diagnóstico)*: RVP/RVN

Os itens de **a** até **c** acima serão expressos em porcentagem.

### 5.3 Estudo de imprecisão

Este estudo será realizado somente para **soro ou plasma** (vide estudo na bula do fabricante). Embora possa ser realizado com amostras controle, recomendamos, preferencialmente, realizar com amostras de pacientes.

5.3.1 **Repetibilidade (intra-ensaio)**: analisar 12 replicatas de três amostras, sendo uma positiva alta, positiva baixa e negativa, preferencialmente com 3 lotes diferentes do kit.

5.3.2 **Intralaboratorial (inter-ensaio)**: analisar 12 replicatas de três amostras, sendo uma positiva alta, positiva baixa e negativa em dias diferentes, podendo-se fazer 4 dosagens x 3 dias.

Devem ser feitas 12 replicatas, 4 dosagens em 3 dias com intuito da publicação em menor tempo hábil, sendo que ambos ensaios correm simultaneamente nas mesmas amostras.

### 5.4 Estudo de correlação:

Embora o método de RT-PCR seja de eleição, sabemos que existe uma janela imunológica para a soroconversão, porem ainda não conhecemos este comportamento para o COVID-19.

No caso dos testes de antígenos devemos ter em conta que a expressão destes na mucosa nasal decai com a evolução da infecção sendo a coleta de amostras realizada conforme período preconizado em bula. Este período em geral é de 5 dias.

#### 5.4.1. Amostras

Realização de, no mínimo 100 amostras, sendo pelo menos 50% destas amostras comprovadamente positivas (vide item 5.1 b), 40% amostras negativas e 5 a 10% amostras próximas ao limite de detecção ou cut-off.

No caso de testes de antígenos temos como amostras positivas aquelas com até 30 CT. Como matriz de comparação usaremos a solução de meio de transporte viral.

Para a sorologia temos a sugestão: utilizar 60 amostras com resultados previamente conhecidos:

- 40 amostras *IgM*

- 10 positivas alto
- 10 negativas verdadeiro
- 7 positivas baixa carga viral
- 7 positivas média carga viral
- 6 positivas baixa carga viral

- 20 Amostras *IgG*

- 5 positivas com *IgM* negativo
- 5 negativas com *IgM* negativa (sem contato)
- 3 *IgG* positivas com *IgM* positiva, baixa carga viral

- 4 IgG positivas com IgM positiva, média carga viral

- 3 IgG positivas com IgM positiva, alta carga viral

*As coletas de amostras seriadas devem ser feitas nos intervalos preconizados no item 5.1.b*

Para kits que recomendam uso de amostra capilar, além das amostras de soro ou plasma, coletar 01 amostra capilar e realizar o teste à beira do leito e registrar o resultado e coletar também uma amostra de soro e outra com anticoagulante (recomendado pelo fabricante).

Realizar a coleta de acordo com as orientações do fabricante.

Enviar a amostras de sangue total (soro ou plasma) ao laboratório para preparo da mesma e realização do teste.

Registrar em planilha todos os dados, conforme modelo anexo.

#### 5.4.2 Procedimento técnico

Realizar o procedimento de acordo com a orientação do fabricante.

Tanto o procedimento com amostra capilar, quanto realização do procedimento no soro ou plasma só deve ser realizado por profissional capacitado (treinado).

## **6. Características de desempenho esperado:**

Esperamos resultados com desempenho equivalente ao encontrado no estudo do fabricante, que vem apontado em bula anexa ao produto.

Porém os kits deverão ser avaliados quanto ao seu desempenho de forma ampla, orientando indicações e limitações do uso do mesmo.

## 7. Aprovação:

Aprovação deverá ser feita de acordo com os resultados encontrados e finalidade de uso do kit e adequação à janela imunológica.

A avaliação final também deverá trazer as limitações do uso (como a janela imunológica, dados epidemiológicos, etc.); advertências (exemplos: quanto a controles da qualidade, ou reprodutibilidade); e outras limitações pertinentes.