

Considerações sobre o uso e a interpretação dos testes diagnósticos na COVID-19.

Nota elaborada em 06/julho/2020

Por se tratar de uma enfermidade muito recente, as informações sobre a COVID-19 têm experimentado alterações frequentes, as quais se devem ao aporte continuado e volumoso de novas informações. Este documento apresenta as informações disponíveis sobre o período de transmissibilidade do vírus e do prazo de desenvolvimento da resposta imune humana contra o SARS-CoV-2 e suas implicações na interpretação dos testes e a pertinente conduta nos indivíduos testados.

Há no momento dois grupos de testes diagnósticos para a COVID-19: um que visa detectar a presença do vírus (o RT-PCR) e o que visa identificar a presença de resposta imune humana contra o vírus (usualmente testes sorológicos, quer sejam os testes rápidos imuno-cromatográficos ou os testes tradicionais de ELISA ou Quimioluminescência).

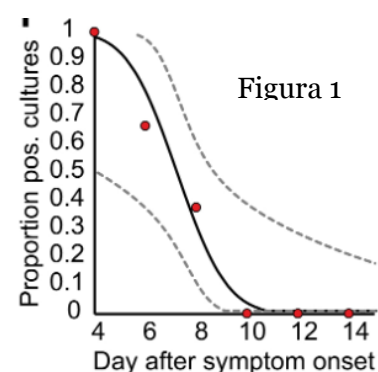
A utilização isolada e/ou combinada dos resultados dos testes RT-PCR (virais) e dos testes rápidos (imunológicos) deve orientar as ações em relação aos pacientes.

Tipo de teste	Objetivo	O que detecta	Quando fazer	Interpretação
RT-PCR para detecção de RNA viral	<ul style="list-style-type: none"> Identificação de casos na sua fase inicial; Investigar os casos que permanecem capazes de transmitir o SARS-CoV-2 por tempo prolongado 	<ul style="list-style-type: none"> Indica a presença de RNA do vírus no local da coleta do material 	<ul style="list-style-type: none"> Nos primeiros 7 dias após os primeiros sintomas; Na identificação de indivíduos infectados (mesmo que sem sintomas) entre os contatos de casos confirmados. 	<ul style="list-style-type: none"> O indivíduo está com infecção pelo SARS-CoV-2, sintomática ou assintomática.
Testes sorológicos (rápidos ou ELISA)	<ul style="list-style-type: none"> Identificar os indivíduos já expostos ao vírus (com ou sem desenvolvimento de COVID-19) 	<ul style="list-style-type: none"> A presença de anticorpos séricos contra antígenos do vírus. Ele indica que a pessoa testada foi infectada (tendo ou não desenvolvido COVID-19). 	<ul style="list-style-type: none"> Após duas semanas do início dos sintomas ou da data de realização de um RT-PCR com resultado positivo; Para avaliação da infecção pregressa pelo SARS-CoV-2 mesmo em indivíduos assintomáticos, seja como contato de casos confirmados seja em inquéritos sorológicos na comunidade. 	<ul style="list-style-type: none"> O indivíduo teve infecção pelo SARS-CoV-2, sintomática ou assintomática. Verificar o valor preditivo positivo do teste.

Detecção de material viral

Em relação aos testes de detecção de material viral, como o RT-PCR, o teste positivo é bastante confiável pois tem elevada especificidade. Devemos lembrar, contudo, que o RT-PCR detecta a presença do RNA do vírus o que, nem sempre, indica a existência de vírus infectante.

Na COVID-19, a carga viral do SARS-CoV-2 na faringe é mais elevada logo antes ou no período do início dos sintomas To et al., 2020), sendo estimado que cerca de 44% da transmissão ocorre no período pré-sintomático (He et al., 2020). Por volta de 10 dias após o início dos sintomas os cultivos já são negativos, embora possa haver positividade do RT-PCR (Fig. 1, em Wolfel et al., 2020). Há relato de persistência de testagem positiva para o vírus por tempo mais prolongado, com uma mediana de 14 dias para pacientes com



sintomas leves e de 19 dias para indivíduos assintomáticos (Long et al., 2020). No caso de pacientes hospitalizados, pode ocorrer persistência do vírus por tempo mais prolongado e, nestes casos, o período de potencial de transmissão viral tem uma mediana de 20 dias (Zwirgmaier et al, 2020).

Assim, a presença de RT-PCR positivo não significa vírus viável. Entretanto, níveis elevados desse material detectável (acima de um milhão de cópias de RNA viral/ml) tem correlação com presença de vírus viável na amostra, o que ocorre geralmente nos primeiros oito dias de início dos sintomas, com algumas exceções. A Figura 2 mostra a estimativa do período de transmissão do SARS-CoV-2 por indivíduos sintomáticos. Uma parte importante da transmissão ocorre no período imediatamente anterior ao desenvolvimento dos sintomas (He et al, 2020).

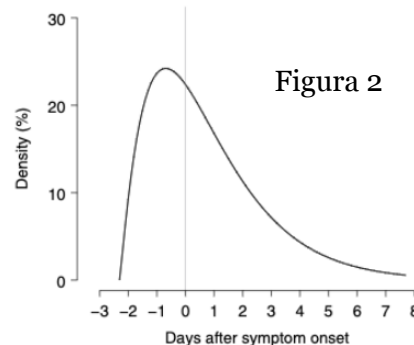


Figura 2

O RT-PCR permite uma avaliação da carga viral a qual é estimada pelo número de ciclos necessários para que o exame se torne positivo. Ou seja, se houver pouco material viral (pequena carga viral ou pouca quantidade de material coletado, por exemplo), serão necessários vários ciclos de amplificação para que o material original se torne detectável. O número de ciclos necessários para determinar a positividade do exame varia de acordo com o teste utilizado. Este aspecto é utilizado em estudos para avaliar o período de transmissibilidade mas não é usado na rotina de trabalho quando o laudo do exame indica apenas se o teste foi reagente ou não.

No momento atual, considerando a) o conhecimento sobre a COVID-19; b) a situação epidemiológica do país com grande número de casos e c) o insuficiente número de testes realizados, podemos interpretar os resultados de RT-PCR da seguinte forma:

No momento atual, considerando a) o conhecimento sobre a COVID-19; b) a situação epidemiológica do país com grande número de casos e c) o insuficiente número de testes realizados, podemos interpretar os resultados de RT-PCR da seguinte forma:

Sintomatol. compat.	RT-PCR	Afast. serviço	Isolamento	Rastreamento e teste dos contatos	Comentário
Sim	Detectável	Sim	Sim	Sim	Avaliar necessidade de tratamento domiciliar ou internação
Sim	Não Detectável	Sim	Sim	Sim	Considerando elevada frequência atual da COVID-19 entre casos sintomáticos, os casos suspeitos, ainda que com RT-PCR negativos, devem ter a mesma conduta dos casos confirmados. Isolamento e rastreamento de contatos mesmo antes de repetir o RT-PCR no caso suspeito.
Não	Detectável	Sim	Sim	Sim	Acompanhar para avaliar desenvolvimento e sintomas. Isolamento e rastreamento de contatos.
Não	Não Detectável	Não	Não	Não	Se se tratar de contato de caso confirmado, recomendar avaliação diária de temperatura e de desenvolvimento de sintomas na semana posterior ao contato.

Um paciente com **sintomatologia compatível com a COVID-19 e/ou com exame de RT-PCR detectável** deve ser orientado para acompanhamento médico e para isolamento no sentido de proteger as pessoas no seu entorno. Considerando que grande parte da transmissão ocorre no ambiente domiciliar e/ou laboral, é necessário orientar para que seus contatos sejam avaliados por RT-PCR. Deve-se atentar que a lista de contatos deve incluir pessoas com as quais esteve no período de 2 dias antes e até 8 dias após o desenvolvimento dos sintomas.

É considerado contato de alto risco, uma pessoa:

- que tenha tido contacto direto com um caso de COVID-19 a menos de dois metros durante mais de 15 minutos;
- que tenha tido contacto físico com um caso de COVID-19;
- que tenha tido contacto direto, sem proteção, com secreções infecciosas de um caso de COVID-19 (p. ex. se lhe tiverem tossido para cima);
- que tenha estado num ambiente fechado (p. ex. em casa, numa sala de aula, sala de reunião, sala de espera do hospital, etc.) com um caso de COVID-19 durante mais de 15 minutos;
- que tenha estado num avião, sentada a uma distância inferior a dois lugares (em qualquer direção) do caso de COVID-19, acompanhantes ou cuidadores, e membros da tripulação em serviço na secção do avião onde estava sentado o caso índice (se a gravidade dos sintomas ou os movimentos do caso identificado indicarem uma exposição mais extensa, podem ser considerados contactos próximos todos os passageiros sentados nessa secção do avião ou todos os passageiros do avião);
- Um profissional de saúde ou outra pessoa que preste cuidados de saúde a um caso de COVID-19, ou técnicos de laboratório que manipulem amostras de um caso de COVID-19, sem o EPI recomendado ou perante uma eventual falha do EPI (WHO, 2020).

Um indivíduo com **sintomatologia compatível com a COVID-19 e com exame de RT-PCR não detectável** deve ser considerado um caso suspeito e ser orientado de acordo com a gravidade do caso. Estima-se que o RT-PCR falha em detectar cerca de 3 em cada 10 casos positivos (revisado em Woloshin et al., 2020). Em relação à potencial transmissão, considerando a possibilidade de que se trate de um resultado falso negativo no RT-PCR, a equipe de saúde e os seus contatos devem tomar as mesmas precauções de um caso confirmado. O rastreio e teste dos contatos deve ser realizado mesmo antes de uma eventual repetição do RT-PCR no caso, pois a janela de identificação de contatos contaminados é estreita.

Os indivíduos **não sintomáticos e com teste RT-PCR detectável** se enquadram como pré-sintomáticos ou assintomáticos. Devem ser afastados do serviço pelo período de 14 dias a partir da coleta do exame e avaliados quanto ao desenvolvimento de sintomas. Caso não desenvolvam sintomas no período, não há necessidade de novo afastamento. Devem ser orientados a contatar o serviço de saúde, se desenvolverem sintomas e, neste caso, devem ser atendidos de acordo com a gravidade do caso. Considerados o período de incubação (Figura 3, de He et al., 2020), a presença do vírus e o potencial de transmissão no período pré-sintomático, devem ser orientados para rastreio e isolamento dos contatos.

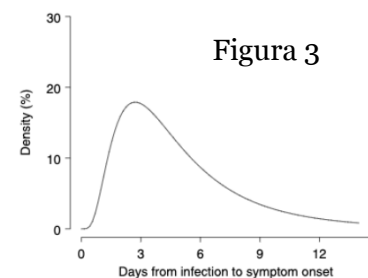


Figura 3

O indivíduo **não sintomático e com RT-PCR não detectável** não requer cuidados especiais. Provavelmente se enquadra como indivíduo testado por ser contato de caso confirmado ou suspeito, pelo que é recomendável ser orientado a realizar aferição diária da temperatura e avaliação de desenvolvimento de sintomas compatíveis com a COVID-19.

Todos os casos suspeitos ou contatos de suspeitos deve ser orientados sobre os todos os sintomas de COVID-19. É importante ressaltar que, independente da intensidade dos sintomas, deve proceder isolamento e identificação dos contatos, conforme recomendação acima, como estratégia para conter a transmissão.

Anticorpos séricos anti-SARS-CoV-2

Um estudo que avaliou 242 pacientes de COVID-19 e 447 controles negativos (soros de junho de 2019), mostrou que no dia 7 pós-sintomas, 44% da população do estudo apresenta soropositividade para IgM e de 56% para IgG. A positividade na IgG chegou a 95% no dia 16, enquanto a IgM só chegou a 95% de positividade no dia 20. Este padrão de positividade rápida de IgG e de resposta mais tardia de IgM na COVID-19 (Xu et al., 2020), difere do observado no diagnóstico de outras enfermidades virais. Estes achados, com dados sólidos numa amostra numerosa e bem avaliada, questionam as interpretações da elevada probabilidade de transmissibilidade do SARS-CoV-2 por indivíduos com positividade da IgM. Considerando que em torno do dia 8 pós-sintomas, a carga viral é negativa ou baixa, quando a IgM ou IgG se tornam positivas o risco de transmissão já

não é elevado na maioria dos casos sintomáticos. Num estudo voltado para a análise da resposta imune celular também foi evidenciada uma forte correlação negativa entre a carga viral e o aparecimento da IgG (Weiskopf et al, 2020).

Uma comparação direta entre a porcentagem de soroconversão para o SARS-CoV-2 e a possibilidade de cultivo celular (Fig. 4), mostra que desde o dia 5 após início dos sintomas a frequência de cultura viral positiva é menor que a de cultivos negativos (Wölfel et al., 2020)

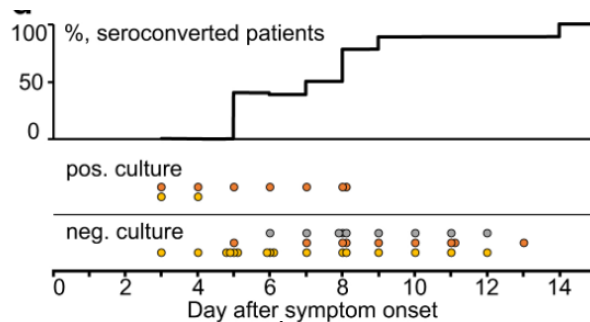


Figura 4

Um estudo que avaliou 37 indivíduos assintomáticos (RT-PCR), mostrou que eles apresentam uma resposta anticórpica mais fraca que a dos sintomáticos (n=37), sendo que 40% dos assintomáticos, e 13% dos sintomáticos, não desenvolveram anticorpos anti- SARS-CoV-2 (Long et al., 2020).

Considerando dados acima, os pacientes com sintomas compatíveis com a COVID-19 devem ser avaliados pelo RT-PCR até 7 dias após os primeiros sintomas, não sendo recomendável a realização do teste sorológico em indivíduos ainda com sintomatologia. Para a solicitação de testes sorológicos em indivíduos assintomáticos, devem ser observados: as características do teste - sensibilidade e especificidade assim como o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo.

Acurácia dos testes de detecção de anticorpos e valores preditivos

O estabelecimento de um diagnóstico é um processo imperfeito baseado em probabilidade, quanto mais elementos tivermos para reduzir a incerteza maior a probabilidade da tomada de decisão correta. Em relação ao teste, devemos atentar para as suas características intrínsecas, sensibilidade e especificidade, e também para o seu valor preditivo positivo, o qual depende da frequência do evento na população testada.

Na situação analisada nesta nota, a acurácia do teste sorológico para SARS-CoV-2, depende da sua sensibilidade (capacidade de identificar corretamente - ser reagente - os indivíduos com anticorpos contra o vírus) e da sua especificidade (capacidade de não ser reagente nos indivíduos sem anticorpos contra o vírus).

As características intrínsecas do teste, sensibilidade e especificidade, são importantes para orientar a escolha de quais dos testes disponíveis se deve usar, mas para a decisão quanto ao paciente é importante analisar também o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) dos testes. O VPP pode ser expresso como: se o teste é reagente qual a probabilidade do indivíduo ter anticorpos contra o SARS-CoV-2? E de maneira complementar, o VPN será frente a um teste não reagente, qual a probabilidade do indivíduo realmente não possuir os anticorpos específicos? O cálculo dos valores preditivos depende das características intrínsecas do teste (um teste com baixa sensibilidade aumenta a frequência de testes falso-negativos e a baixa especificidade aumenta a frequência de falso positivos), mas também da prevalência do evento na população específica. Ao usar o mesmo teste em cidades com prevalência distinta o VPP será diferente em cada uma delas. Como exemplo, compararemos o VPP obtido em 3 cidades usando um mesmo teste com 94% de sensibilidade e 95% de especificidade e considerando a percentagem de sorologia positiva na 3a fase (21-24 de junho) da EPICOVID.

População de	Prevalência (%)	VPP (%)
Salvador	3,7	42
Rio de Janeiro	10,3	68
Fortaleza	20,2	83
Indivíduos 15 dias após início dos sintomas de COVID-19	80	99

Podemos ver que o mesmo teste aplicado na população aleatoriamente escolhida em Salvador teria um VPP de 42% (cerca de 6 de cada 10 testes positivos seriam falso positivos) enquanto na população aleatoriamente escolhida em Fortaleza, o VPP seria de 83 (cerca de 17 de cada 100 testes positivos seriam falso positivos). Considerando a prevalência relativamente baixa da doença nessas cidades no momento em que foi feito o inquérito, um teste com 95% de sensibilidade e 95% de especificidade não deve ser interpretado do ponto de vista individual devido ao percentual elevado de falso positivos. Contudo, sabemos que 80% dos indivíduos que tiveram a COVID-19 são soropositivos 15 dias após o início dos sintomas. O mesmo teste aplicado na população de indivíduos pós-COVID-19 terá um VPP de 99%, ou seja em cada 100 testes positivos só 1 deles é provavelmente falso positivo.

IgM	IgG	Afast. serviço	Comentário
Reagente	Reagente	Não	O paciente desenvolveu resposta imune contra o SARS-CoV-2 mas não há certeza que os anticorpos confirmam proteção em todos os casos nem por quanto tempo perdura a proteção. O paciente deve ser orientado a continuar com as medidas de proteção.
Não reagente	Reagente	Não	No caso de teste realizado em indivíduo que não apresentou sintomatologia prévia compatível com a COVID-19, deve ser avaliado o valor preditivo positivo (ou probabilidade pré-teste) para estimar a possibilidade de teste falso-positivo; Se o paciente fez quadro prévio compatível com a COVID-19, ele desenvolveu imunidade contra o SARS-CoV-2 mas ainda não há certeza de que esteja protegido. O paciente deve ser orientado a continuar com as medidas de proteção.
Reagente	Não reagente	Avaliar	A IgM isoladamente provavelmente não é capaz de conferir proteção; Como a IgM aparece tardiamente na COVID-19, este resultado NÃO indica necessariamente que ainda há vírus infeccioso na faringe, embora isto possa ocorrer. O médico deve avaliar a necessidade de afastamento do serviço e da realização do exame RT-PCR considerando vários elementos, como: se o paciente é contato de paciente com COVID-19 confirmada; se teve sintomatologia compatível, ainda que leve, nos dias anteriores ao exame; se está com temperatura elevada (igual ou acima de 37,5° C) etc.; O paciente deve ser orientado a continuar com as medidas de proteção.
Não reagente	Não reagente	Não	Não há evidência que o paciente tenha desenvolvido imunidade contra o SARS-CoV-2. Ele parece não ter sido infectado pelo SARS-CoV-2. Entretanto, deve-se lembrar que o teste não avalia infecção aguda. O paciente deve ser orientado a continuar com as medidas de proteção.

Cautela em relação à interpretação de proteção pela IgG

A detecção de anticorpos IgG, como nos testes rápidos, e mesmo a presença de IgG anti-SARS-CoV-2 em títulos elevados, o que pode ser aferido por testes como o ELISA, nem sempre se correlacionam proteção contra infecção (Wolfel et al, 2020; To et al, 2020) e devemos manter uma atitude cautelosa neste aspecto. Um estudo recente (ainda em estágio de revisão), com dados de 175 pacientes com quadros moderados de COVID-19, da China, mostrou que 25% deles exibiu uma baixa produção de anticorpos neutralizantes e que 5% não chegaram a desenvolver este tipo anticorpos Fan et al., 2020). Por outro lado, um estudo com 149 indivíduos convalescentes de COVID-19 mostrou que anticorpos específicos para o domínio de ligação com o receptor, embora em níveis baixos, tiveram elevada atividade anti-viral e foram encontrados em todos os indivíduos testados (Robbiani et al., 2020).

Há relato de reação cruzada (IgM e IgG) em dois pacientes com a resposta para dengue em alguns testes de detecção da resposta sorológica (Yan et al. 2020). A situação endêmica da Dengue no Brasil pode resultar em que pacientes com Dengue apresentem resultados falso-positivos no teste sorológico para SARS-CoV-2, não indicando, assim, resposta imune contra o SARS-CoV-2.

Adicionalmente, devemos considerar a possibilidade do fenômeno de agravamento da enfermidade por anticorpos (*antibody-dependent enhancement*) a qual tem sido levantada em alguns artigos (ver Peron & Nakaya, 2020).

Considerações finais

- A. As medidas de isolamento devem ser feitas baseadas em suspeita clínica ou história de contato com caso suspeito antes mesmo do resultado do RT-PCR;
- B. Em caso com suspeita clínica de COVID-19, o teste de RT-PCR negativo não afasta completamente o diagnóstico, considerando sensibilidade de 70%;
- C. Considerando a elevada especificidade do RT-PCR, um resultado positivo provavelmente indica tratar-se de pessoa infectada, mesmo se assintomática;
- D. Os testes sorológicos tem pouco valor diagnóstico em casos individuais, ou de interpretação de exposição prévia, em locais onde a prevalência da COVID-19 é baixa;
- E. Os testes sorológicos não dão diagnóstico de infecção atual ou ativa pelo SARS-CoV-2;
- F. Os testes sorológicos não são adequados para rastreamento e isolamento de contatos.

Referências

- Fan, W. et al., **Neutralizing Antibody Responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 Recovered Patient Cohort and Their Implications** (Março/28/2020). <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3566211>
- He, X., et al. (2020). **Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19** Nature Medicine <https://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
- Long, et al. (2020). **Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections** Nature Medicine <https://dx.doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>
- Peron, J., Nakaya, H. (2020). **Susceptibility of the Elderly to SARS-CoV-2 Infection: ACE-2 Overexpression, Shedding, and Antibody-dependent Enhancement (ADE)** Clinics 75(0) <https://dx.doi.org/10.6061/clinics/2020/e1912>
- Robbiani, D. et al. (2020). **Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals** Nature <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9>
- To, K., et al. (2020). **Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study**. The Lancet. Infectious diseases 20(5), 565-574. [https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
- Weiskopf, D., et al. (2020). **Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome** Science Immunology 5(48) <https://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071>
- Wölfel, R., et al. (2020). **Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019** Nature <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
- Woloshin, S., Patel, N., Kesselheim, A. (2020). **False Negative Tests for SARS-CoV-2 Infection — Challenges and Implications**. New England Journal of Medicine <https://dx.doi.org/10.1056/nejmp2015897>
- World Health Organization (WHO). **Home care for patients with suspected novel coronavirus (nCoV) infection presenting with mild symptoms and management of contacts** [internet]. Geneva: WHO; 2020 [accessed 4 February 2020]. Available from: [https://www.who.int/publications-detail/home-care-for-patients-with-suspected-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-presenting-with-mild-symptoms-and-management-of-contacts](https://www.who.int/publications-detail/home-care-for-patients-with-suspected-novel-coronavirus-(ncov)-infection-presenting-with-mild-symptoms-and-management-of-contacts).
- Xu, et al. **Seroprevalence of immunoglobulin M and G antibodies against SARS-CoV-2 in China**. Nat Med (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0949-6>
- Yan, G., et al. (2020). **Covert COVID-19 and false-positive dengue serology in Singapore** The Lancet Infectious Diseases [https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30158-4](https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30158-4)
- Zwirgmaier, K., Drosten, C., Wendtner, C. (2020). **Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019** Nature <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>

Responsáveis

Marília Santini, Viviane Boaventura, Aldina Barral e Manoel Barral-Netto.