



NOTA TÉCNICA SOBRE A UTILIZAÇÃO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO DO SARS COV2 POR RT-QPCR EM RELAÇÃO AOS TESTES RÁPIDOS SOROLÓGICOS



UNIVERSIDADE
FEDERAL
DE PERNAMBUCO

Nota técnica em virtude do convênio entre a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e Associação Municipalista de Pernambuco (AMUPE) para realização de exames para diagnóstico da Covid-19.

NOTA TÉCNICA SOBRE A UTILIZAÇÃO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO DO SARS COV2 POR RT-QPCR EM RELAÇÃO AOS TESTES RÁPIDOS SOROLÓGICOS

Universidade Federal de Pernambuco, 04 de Agosto de 2020.

Autores:

Michelly Cristiny Pereira
Michelle Melgarejo Rosa
Breno Caldas de Araujo
Priscila Stella Santana de Oliveira
Anderson Rodrigues de Almeida
Amanda Pinheiro de Barros Albuquerque
Eudes Gustavo Constantino Cunha
Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego
Maira Galdino da Rocha Pitta

A pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2 tem causado grandes transtornos para saúde pública, economia e para a sociedade em todo o mundo, desde o primeiro caso registrado em Wuhan, na China, no final de 2019. Muitos países conseguiram conter de forma eficiente a transmissão, com medidas de isolamento social e testagem ampla da população, de forma rápida e eficiente (1,2).

O Brasil ainda evolui diariamente em números de pacientes infectados. Dados do Ministério da Saúde, registram até a data de dois de julho, mais de 1 milhão e 400 casos, com 61.884 mortes. Em Pernambuco, até a mesma data, soma-se 61.119 casos de COVID-19 com 4.968 óbitos registrados (3,4).

No início do mês de julho, cinco meses após o início do primeiro caso registrado no Brasil, não se tem realizado testagem em massa para o diagnóstico e rastreamento de casos de COVID-19. Ademais, muitos Estados finalizaram medidas de isolamento social, tornando o país o 2º epicentro da doença no mundo.

Os países que adotaram medidas intensivas de vigilância por meio da testagem irrestrita da população, obtiveram sucesso na diminuição de novos casos, como por exemplo a Coreia do Sul (5). Desta forma, o diagnóstico preciso e eficaz em maior número de pessoas é umas das formas mais seguras de evitar que a doença atinja proporções ainda maiores.

Em Pernambuco, desde o primeiro caso registrado, em 12 de março de 2020, foram realizados mais de 60.000 testes por PCR em tempo Real (4). A testagem ampla, associada as medidas de isolamento social foram imprescindíveis para a “aparente” redução do número de casos na Região Metropolitana do Recife. No entanto, segundo dados da Secretaria do Estado de Pernambuco, o número de casos aumenta para os municípios do interior do Estado, como Vitória de Santo Antão (344 casos), Água Preta (169 casos), Palmares (153 casos), Escada (109 casos) e Petrolina (101 casos) e, especialmente Caruaru, que aparece com 501 casos de Síndrome Respiratório Aguda Grave (SRAG) confirmados para COVID-19 (4).

A escolha de testes para a confirmação do diagnóstico da COVID-19 é uma responsabilidade importante dos gestores públicos, uma vez que o rastreamento populacional em larga escala e de forma eficiente pode mudar o impacto da pandemia. O exame para diagnóstico da COVID-19 preconizado pela OMS se baseia na técnica molecular de amplificação do material genético viral do SARS-CoV-2. A técnica é denominada RT-PCR (RT-PCR, do inglês, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), e as amostras são coletadas a partir de secreções nasofaríngeas e/ou orofaríngeas obtidas pelo swab (“cotonete; haste”). É considerado o teste mais específico e sensível, com diferenças a depender do kit comercial utilizado. A eficiência do teste por RT-PCR para a maioria dos kits é acima de 96% e não há reação cruzada com outros vírus respiratórios, o que aumenta a especificidade de detecção (6).

Um estudo avaliou amostras de 1070 pacientes e verificou a detecção de SARS-Cov-2 por RT-qPCR em diferentes amostras biológicas, com sensibilidade de 93% para o lavado bronqueoalveolar, 72% para escarro, 63% para amostras do swab nasal, 32% swab da orofaringe e apenas 1% para o sangue (7). O vírus pode ser detectado em até dois dias antes dos sintomas clínicos, com pico de carga viral entre o 4º e 5º dias, pós sintomas, ou seja, a sensibilidade do teste é maior na fase aguda da infecção (8, 9).

Outros exames, especialmente os rápidos do tipo sorológicos têm sido utilizados amplamente no Brasil, incluindo no Estado de Pernambuco. No último boletim epidemiológico de Pernambuco, foi divulgado a utilização de mais de 59.000 testes rápidos (4). No entanto, estes testes sorológicos não são indicados para diagnóstico da COVID-19 e sim para um rastreamento prévio de quem teve contato com o vírus, uma vez que, detectam anticorpos IgM e IgG contra o SARS-CoV2. No organismo infectado, os anticorpos do tipo IgM são os primeiros a serem produzidos, e por isso estão relacionados a infecções recentes, e os anticorpos do tipo IgG são produzidos em uma fase posterior.

Dessa forma, a utilização dos testes sorológicos para o diagnóstico da COVID-19, que detectam a presença desses anticorpos (IgM e IgG), representa uma desvantagem devido ao período necessário para a produção dessas moléculas pelo organismo, uma vez que a produção ocorre somente alguns dias após a infecção. Adicionalmente, ainda não se sabe ao certo o tempo que esses anticorpos permanecem no corpo, e os níveis encontrados podem ser diferentes em casos graves, leves e assintomáticos, com maior produção nos casos graves, o que aumenta as chances dos resultados falsos negativos nos casos leves e assintomáticos. Por esses motivos, atualmente é recomendado o uso da RT-PCR como ferramenta para o diagnóstico da COVID-19, uma vez que essa técnica permite a detecção do material genético do vírus SARS-CoV-2 (16-18)

As pesquisas realizadas que avaliaram os índices de acurácia dos testes sorológicos, ou seja, o quanto os resultados obtidos nesses testes são exatos, mostraram uma grande variabilidade nesses valores. Em pacientes que tiveram o diagnóstico confirmado da COVID-19 os valores de sensibilidade e especificidade para IgM foram 77,3% e 100%, enquanto que para IgG foram de 83,3% e 95%. Na fase inicial da doença, 7 dias após o início dos sintomas, os testes realizados para detecção de anticorpos IgM e IgG apresentaram valores de sensibilidade de 28,7% e 19,1%. A sensibilidade de um teste diz respeito a capacidade do teste detectar a doença em um indivíduo que esteja infectado, e a especificidade trata sobre a capacidade do teste ser negativo em um indivíduo que não esteja com a doença.

Dessa forma, baixos valores de sensibilidade mostram que o teste apresenta grandes chances de fornecer resultados falsos negativos, ou seja, pessoas que têm a doença podem receber um resultado negativo. Já os baixos valores de especificidade estão relacionados com grande probabilidade de resultados falsos positivos, ou seja, pacientes que não têm a doença podem receber um resultado positivo (15-16). Dentre os testes sorológicos acima citados estão o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), o ensaio de quimiluminescência e os testes rápidos (imunocromatográficos). Apesar dos testes rápidos apresentarem resultados, em média de 15 a 20 minutos, este método de detecção apresenta desempenho inferior aos demais. Em geral, as sensibilidades dos kits registrados na ANVISA para detecção de IgM, anticorpo relacionado a fase aguda da doença, estão em torno de 85%. Esta baixa sensibilidade do teste pode conduzir a uma maior probabilidade de diagnóstico de falsos-negativos e consequentemente, subnotificação dos casos.

Outro fato notório é que a sensibilidade do teste rápido pode variar conforme o tipo de amostra biológica coletada de uma mesma pessoa. Um grupo do Hospital das clínicas de São Paulo identificou que a coleta de sangue capilar, popularmente conhecida como “furo na ponta do dedo”, apresentou sensibilidade de 55% (10-13).

Vale salientar que, recentemente, um estudo revelou que o principal tipo de imunidade adquirida em pacientes leves que tiveram COVID-19 não é por anticorpos. Dessa maneira, o diagnóstico de pessoas assintomáticas ou com sintomas leves por testes rápidos se mostra evidentemente ineficaz (14).

Portanto, o uso amplo de testes sorológicos para fins de diagnóstico poderá causar grandes transtornos de saúde pública, uma vez que podem gerar subnotificação de casos de COVID-19, além de ampliar a disseminação da epidemia em decorrência da não detecção dos pacientes positivos.

A partir do diagnóstico eficiente da população, a dinâmica do enfrentamento da situação torna-se mais eficiente, principalmente por diferenciar os pacientes infectados pelo COVID-19 dos demais infectados, com outras doenças respiratórias. O correto protocolo de isolamento evita a disseminação do vírus. Outra vantagem de um diagnóstico laboratorial preciso é uma melhor condução no tratamento do paciente, contribuindo assim para a sua qualidade de vida. O Quadro abaixo resume as diferenças entre os dois tipos de testes.

Quadro 1 – Comparativo de aspectos entre testes do tipo RT-PCR e Testes Rápidos Sorológicos

	Teste – RT-PCR	Teste - Sorológicos
Por que é utilizado?	Considerado o “padrão ouro” ou “padrão de referência”, o RT-PCR é o exame que identifica o vírus e confirma a COVID-19.	Procura anticorpos, imunoglobulinas solúveis no sangue. Quando positivo, sinaliza contato prévio com o vírus.
Qual o significado de um resultado positivo?	Pessoa tem confirmação de contaminação pela COVID-19.	Sinaliza contato prévio com o vírus.
Qual o significado de um resultado negativo?	Alta probabilidade da pessoa não estar infectada no momento da coleta.	Indica que provavelmente a pessoa não teve contato prévio com o vírus.
Qual a importância dos testes?	Determina o número correto de pessoas infectadas Além de identificar quem poderá transmitir o vírus.	Pode identificar se a pessoa já teve contato prévio com o vírus.
Qual o tempo para detecção de carga viral ou anticorpos?	O teste molecular estilo rtPCR pode detectar carga viral desde o dia zero de contaminação, até 45 dias após.	Os anticorpos serão detectados pelo menos 10 dias após o contato com o vírus, ou poderão sugerir contaminação prévia.
Caso o resultado for positivo, quais as medidas a serem adotadas?	Pessoas positivas para a COVID-19 deveram ficar isoladas socialmente por um período, de pelo menos, 14 dias.	Deverá ser encaminhada para realização do teste molecular via PCR para confirmar contaminação viral.

Fonte: Os Autores, dados da pesquisa (2020)
Adaptado de ANVISA (2020); Ministério da Saúde (2020).

Referências

- 1- Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- 2- vanKasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol.* 2020;128:104412. doi:10.1016/j.jcv.2020.104412
- 3- <http://portal.saude.pe.gov.br/boletim-epidemiologico-covid-19>
- 4- Boletim epidemiológico SES-PE - <https://t.co/nNNWdilers?amp=1>
- 5- Kang J, Jang YY, Kim J, et al. South Korea's Responses to Stop the COVID-19 Pandemic [published online ahead of print, 2020 Jun 6]. *Am J Infect Control.* 2020;S0196-6553(20)30360-6. doi:10.1016/j.ajic.2020.06.003
- 6- vanKasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol.* 2020;128:104412. doi:10.1016/j.jcv.2020.104412
- 7- Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA.* 2020;323(18):1843–1844. doi:10.1001/jama.2020.3786
- 8- Park M, Won J, Choi BY, Lee CJ. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR [published online ahead of print, 2020 Jun 16]. *Exp Mol Med.* 2020;1-15. doi:10.1038/s12276-020-0452-7
- 9- Wolfel, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581, 465–469 (2020).
- 10- COVID-19 Testing: PCR, Antigen, and Antibody Tests Explained <https://87news.com.br/noticia/4214/testes-pcr-podem-ter-ate-50-de-falsos-positivos-alertam-especialistas>
- 11- ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Diagnóstico: três novos testes de covid-19 ganham autorização. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/tres-novos-testes-de-covid-19-ganham-autorizacao/219201/. Acesso em 02/07/2020.

12- MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. ACURÁCIA DOS TESTES DIAGNÓSTICOS REGISTRADOS PARA A COVID-19, Abril 2020. Disponível em: <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/May/13/AcuraciaDiagnostico-COVID19-atualizacaoC.pdf>

13- Santos VAD, Rafael MM, Sabino EC, Duarte AJDS. Sensitivity of the Wondfo One Step COVID-19 test using serum samples. *Clinics (Sao Paulo)*. 2020;75:e2013. Published 2020 Jun 3. doi:10.6061/clinics/2020/e2013.

14- TakuyaSekine, André Perez-Potti, Olga Rivera-Ballesteros et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *bioRxiv* 2020.06.29.174888; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.06.29.174888>.

15- COVID-19 Testing: PCR, Antigen, and Antibody Tests Explained <https://87news.com.br/noticia/4214/testes-pcr-podem-ter-ate-50-de-falsos-positivos-alertam-especialistas>

16- COVID-19: an update on diagnostic and therapeutic approaches. Mahalaxmilyer, KaavyaJayaramayya, Mohana Devi Subramaniam, Soo Bin Lee, Ahmed AbdalDayem, Ssang-Goo Cho, and BalachandarVellingiri. *BMB Rep*. 2020 Apr 30; 53(4):191–205.

17-http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/covid-19-saiba-mais-sobre-testes-rapidos/219201/pop_up?101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR

18-Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet Infectious Diseases* 2020; 20: 411–412. idade de vida. O Quadro abaixo resume as diferenças entre os dois tipos de testes.