

COVID-19

Entendendo a doença e os testes
utilizados para o diagnóstico



Este trabalho é uma revisão da literatura sobre a COVID-19, seu objetivo é trazer informações sobre a ação do SARS-CoV-2 no organismo humano, o quadro clínico, a resposta imunológica, as complicações e gravidade da doença, mas principalmente contribuir no esclarecimento do uso dos testes diagnósticos para o combate dessa pandemia.

Houve enormes avanços nos métodos diagnósticos para doenças infecciosas nos últimos 40 anos, as metodologias de uso na sorologia evoluíram muito e permitiram, não só a redução da janela imunológica, tornando os testes mais eficientes, como trouxeram facilidades na sua aplicação. Estas, associadas aos métodos moleculares, tem tornado possível uma melhor condução dos casos clínicos, bem como identificado, com mais facilidade, portadores de doenças infecciosas, sendo de enorme utilidade em saúde pública.

Assim, o entendimento de sua aplicação e de suas limitações tornam os testes sorológicos ferramentas importantes nas medidas de contenção da pandemia.

As informações contidas na seção “Diagnóstico Laboratorial da COVID-19” seguem as diretrizes estabelecidas pelas várias instituições internacionais de referência, tais como OMS, Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, *Johns Hopkins University*, *Food and Drug Administration (FDA)*, *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)*, *FIND – Foundation for Innovative New Diagnostics* de Genebra, Suíça, etc.

Nossa empresa espera estar contribuindo na melhor compreensão sobre essa infecção e no uso coerente dos testes sorológicos.

COVID-19

ENTENDENDO A DOENÇA E OS TESTES UTILIZADOS PARA O DIAGNÓSTICO

Índice do Conteúdo

• Introdução	4
• O Vírus SARS-CoV-2 e sua ação na célula humana	4
• Transmissão do vírus	6
• Principais sintomas e algumas características da COVID-19	6
• Breve revisão sobre o sistema imunológico	8
• Resposta imune ao SARS-CoV-2	10
• Tempestade de citocinas	11
• Diagnóstico laboratorial da COVID-19	14
• Teste molecular RT-PCR	15
• Testes de pesquisa de antígeno viral	16
• Testes sorológicos	17
• Alvos antigênicos e cinética dos anticorpos	17
• Tipos de testes sorológicos	18
• Desempenho dos testes sorológicos	19
• Estratégias a serem utilizadas na aplicação dos testes sorológicos	22
• Estratégias a serem usadas para melhorar o Valor Preditivo Positivo (VPP) do teste	24
• Limitações dos testes sorológicos	24
• Recomendações para uso de testes sorológicos	25
• Por que os testes sorológicos são necessários na COVID-19?	25
• Referências Bibliográficas	26
• Estudos e avaliações do teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM	32
• Estudo comparativo do teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica com um Ensaio de Quimioluminescência (CLIA) com Soros Positivos e Negativos para COVID-19	32
Relatório de Estudo de Sensibilidade e Especificidade do Teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica para Aplicação Populacional	32
• Avaliação do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica pelo Programa de Avaliação de kits para Coronavírus através de Projeto Conjunto entre a SBPC/ML, SBAC, ABRAMED e CBDL	34
• Avaliação do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica pelo INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) da FIOCRUZ	35
• Validação do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica. Instituto René Rachou, FIOCRUZ Minas	36
• Avaliação do Teste Rápido COVID-19 IgG/IgM contra o SARS-CoV-2 da WAMA Diagnóstica. Realizado no Laboratório Nacional de Microbiologia de Saúde Pública, Canadá	37
• Novas Avaliações que o Imuno-Rápido COVID-19 da WAMA Diagnóstica vem sendo Submetido... ..	39

COVID-19

O VÍRUS, FISIOPATOLOGIA, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, TESTES DIAGNÓSTICOS E SUA INTERPRETAÇÃO

INTRODUÇÃO

A pandemia da doença do novo coronavírus continua afetando grande parte do mundo. Ela foi relatada pela primeira vez em dezembro de 2019, na China, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) denominou a doença de coronavírus 2019 (COVID-19) e o vírus como causador da síndrome respiratória aguda severa coronavírus 2 (SARS-CoV-2). Esse patógeno pertence à família *Coronaviridae*, e ao gênero *betacoronavirus*. O SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus conhecido por infectar seres humanos, os outros são o SARS-CoV, causador da síndrome respiratória aguda severa, o MERS-CoV, causador da síndrome respiratória do Oriente Médio, sendo que todos esses podem se replicar no trato respiratório inferior e causar pneumonia, a qual pode ser fatal, e os que estão associados a sintomas leves, como o HKU1, NL63, OC43 e 229E (1).

O nome coronavírus é devido às espículas na sua superfície, que lembram uma coroa (do latim corona). A similaridade genética entre esses vírus já é bem conhecida, sendo que o SARS-CoV-2 tem quase 80% de similaridade com o SARS-CoV e 50% com o MERS-CoV (2,3,6). Entretanto, sua maior similaridade é com o coronavírus de morcego, 98% (3).

A COVID-19 é fatal em 2% dos casos, enquanto a SARS-CoV teve uma taxa de mortalidade de 10%, no surto de 2003 (4), e a MERS-CoV matou 34% entre 2012 e 2019 (5).

O VÍRUS SARS-CoV-2 E SUA AÇÃO NA CÉLULA HUMANA

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples que codifica 9.860 aminoácidos. O genoma contém 14 ORFs (*Open Reading Frames*) que codificam 27 proteínas. Dois terços do RNA viral,

localizado principalmente na primeira ORF codifica 16 proteínas não estruturais (NSP), enquanto as demais ORFs codificam proteínas estruturais e acessórias (7). As quatro proteínas estruturais são: a proteína spike (S), a proteína membrana (M), a proteína nucleocapsídeo (N) e a proteína envelope (E). A proteína S pode ser subdividida em S1 e S2. A S1 é responsável pela ligação aos receptores celulares através da porção RDB (*Receptor-Binding Domain viral*), cujo principal receptor é a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (8), enquanto S2 é responsável pela entrada na célula após a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira (9,10, 11). As proteínas S, M e E juntas formam o envelope do vírus. A proteína M é a mais abundante, responsável principalmente pela forma do envelope. A proteína E é a menor proteína estrutural. As proteínas S e M são proteínas transmembrana envolvidas na montagem do vírus durante a replicação, enquanto a proteína N permanece associada ao RNA formando um nucleocapsídeo dentro do envelope viral. A figura 1 mostra as proteínas na estrutura viral.

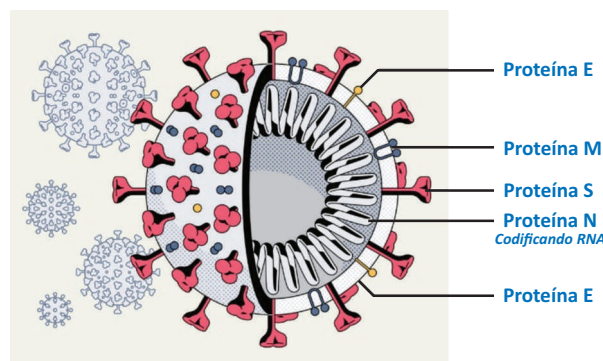


Figura 1 – Proteínas do SARS-CoV-2

Fonte: Manuel Bortoletti via *The Economist*

A característica do genoma que mais difere no novo coronavírus é o gene S que codifica a proteína S responsável pela ligação viral e entrada na célula hospedeira. Assim, um alvo óbvio de uma vacina à base de proteínas e a utilização de anticorpos neutralizantes é, portanto, a proteína S, que se liga ao receptor ACE2 na célula hospedeira (Figura 2), e, especialmente, a subunidade S1, que desempenha um papel central na adesão do vírus à célula (12, 13).

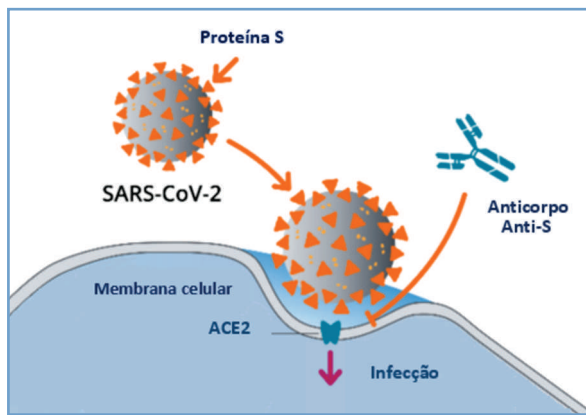


Figura 2 – Ligação da proteína S ao receptor celular ACE2

A patogênese do coronavírus, pode ser resumida pela entrada do vírus na célula epitelial pulmonar através da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), (figura 3).

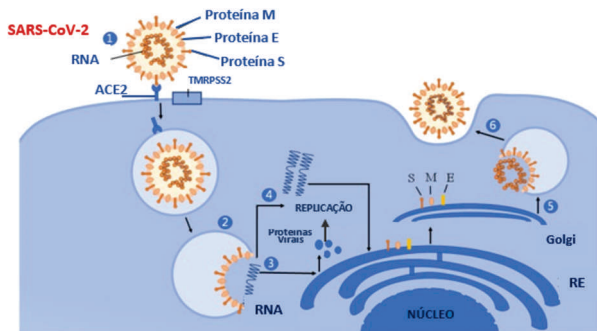


Figura 3. [1] A proteína spike (S) do virion se liga à ACE2, a qual é o receptor da superfície celular. [2] O viriônio libera seu RNA. [3] Alguns RNA são traduzidos em proteínas pela célula. [4] Algumas dessas proteínas formam um complexo de replicação para gerar mais RNA. [5] Proteínas e o RNA é reunido para formar um novo SARS-CoV-2 no aparelho de Golgi e [6] o novo vírus é liberado.

Fonte: Zhang, Y., Geng, Tan, Y., *New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system*, *Biom and Pharm*, 127, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110195> (Referência 102)

A ACE2 está abundantemente presente em humanos nos epitélios do pulmão e intestino delgado, mas também em vários outros órgãos e tecidos, tais como mucosa oral e nasal, nasofaringe, estômago, cólon, pele, linfonodos, timo, medula óssea, baço, fígado, rim e cérebro. Portanto, uma vez no sistema circulatório, é provável que o SARS-CoV-2 se espalhe pelo fluxo sanguíneo, o que sugere que o SARS-CoV-2 não afeta apenas o sistema respiratório, mas também é uma ameaça potencial ao sistema digestivo, sistema urogenital, sistema nervoso central e sistema circulatório (102).

Ao entrar no organismo humano, o SARS-CoV-2 liga-se ao receptor ACE2 da célula alvo após a ativação da proteína S por uma serina protease transmembrana (TMPRSS2) presente no epitélio das células pulmonares, a qual tem a função de clivar a proteína S na junção S1 e S2, permitindo a fusão das membranas viral e celular, processo esse conduzido pela subunidade S2. Portanto, o SARS-CoV-2 envolve a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor de entrada e usa a TMPRSS2 da membrana celular para a iniciação da proteína S (103, 104).

A proteína N pode ser usada como marcador em ensaios de diagnóstico devido ao seu alto nível imunogênico, pois, embora não seja tão imunodominante como a proteína Spike, a qual induz a resposta imunológica mais forte, ela é altamente imunogênica e é profusamente super expressada durante a infecção (14). O desafio no uso da nucleoproteína N é a semelhança entre as cepas de coronavírus. Ao contrário da proteína S, a N mostra menos variação genética, especialmente entre SARS-CoV-2 e o geneticamente distinto SARS-CoV de 2002. O problema aqui é que os anticorpos para a nucleoproteína N do SARS-CoV têm o potencial de reagir de forma cruzada com a nucleoproteína SARS-CoV-2, isto é, os mesmos anticorpos são capazes de se ligar à nucleoproteína N de ambos os coronavírus. De fato, estudos demonstraram que a nucleoproteína N do coronavírus é amplamente reativa (15).

TRANSMISSÃO DO VÍRUS

Sendo o SARS-CoV-2 um vírus transmitido pelo ar, sua transmissão é feita da mesma maneira que o resfriado e a gripe. O vírus se espalha de uma pessoa infectada ao tossir ou espirrar, deixando pequenas gotas no ar. Portanto, a pessoa que inala essas gotículas ou toca as superfícies infectadas também pode ser infectada.

Em trabalhos recentes, o SARS-CoV-2 vivo foi detectado nas fezes dos pacientes, evidenciando a subsistência do SARS-CoV no trato gastrointestinal, justificando os sintomas gastrointestinais, provável transmissão do vírus por via fecal-oral (16, 17). No entanto, não é certo se o consumo de alimentos contaminados por vírus pode causar infecção e transmissão (18).

PRINCIPAIS SINTOMAS E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA COVID-19

O período de incubação da COVID-19 é estimado em 14 dias, com um tempo médio de 4 a 5 dias (19).

Ao ser infectado, o indivíduo passa por um estágio de replicação viral nos primeiros dias, seguido por um estágio de imunidade adaptativa nos dias que se seguem (21). No estágio replicativo, o vírus se replica, levando à um quadro semelhante à gripe, caracterizada por sintomas leves, devido ao efeito citopático direto do vírus. No estágio da imunidade adaptativa, os níveis virais diminuem à medida que o sistema imunológico assume o controle, mas a tempestade inflamatória de citocinas leva à destruição dos tecidos e à deterioração clínica, o que explica o fenômeno em que os pacientes permanecem relativamente bem inicialmente antes de se deteriorarem repentinamente. Isso implica o início precoce de terapias antivirais para melhores resultados e o uso de terapias imunossupressoras no estágio imune adaptativo (22).

Quadro clínico (23, 24):

1. Doença Leve:

- indivíduo sem sintomas ou sintomas leves do trato respiratório superior ou
- tosse, mialgia ou fraqueza, sem falta de ar ou redução da saturação de oxigênio.

2. Doença Moderada:

- indivíduos estáveis com sintomas ou sinais respiratórios e/ou sistêmicos,
- saturação de oxigênio acima de 92% ou acima de 90% nos pacientes com doença pulmonar crônica.
- prostração, fraqueza intensa, febre superior a 38 °C ou tosse persistente,
- sinais clínicos ou radiológicos de envolvimento pulmonar,
- nenhum indicador clínico ou laboratorial de gravidade clínica.

3. Doença Severa: pacientes que atendem a um dos seguintes critérios:

- Frequência respiratória ≥ 30 respirações/minuto,
- saturação de oxigênio $\leq 92\%$, em repouso.
- relação pressão arterial de oxigênio (PaO₂)/fração inspirada de oxigênio (FiO₂) ≤ 300 .

4. Doença Crítica: paciente que atende a um dos seguintes critérios:

Insuficiência Respiratória:

- insuficiência respiratória grave (relação PaO₂/FiO₂ < 200), dificuldade respiratória ou
- síndrome do desconforto respiratório aguda (SDRA), incluindo pacientes em deterioração apesar das formas avançadas de suporte respiratório (ventilação não invasiva, oxigênio nasal de alto fluxo)

ou

Outros Sinais de Deterioração Significativos:

- hipotensão ou choque,

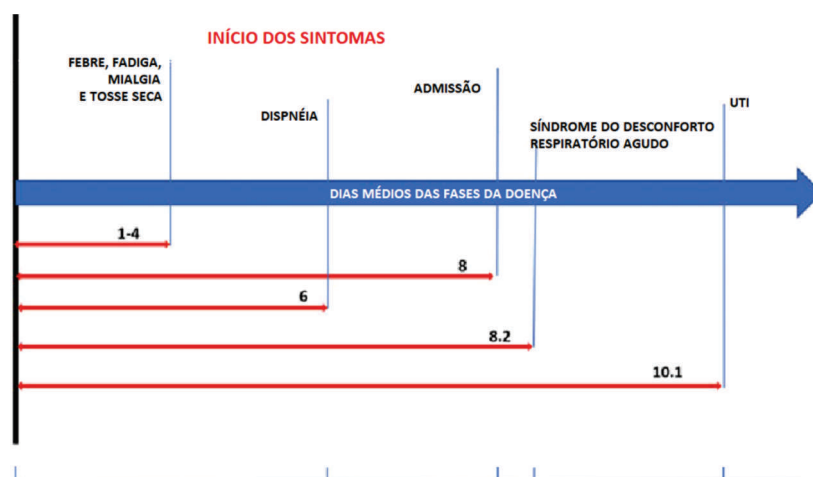
- comprometimento da consciência,
- falência de outros órgãos

O espectro da doença varia de doença leve (sem ou leve pneumonia) em 81%, com um período de recuperação de cerca de 2 semanas, adoença grave (dispneia, hipóxia ou > 50% de envolvimento pulmonar com imagens sendo observadas em 24 a 48 horas) em 14%, com um período de recuperação de cerca de 3 a 6 semanas, até doença crítica (SDRA, sepse, choque séptico ou síndrome disfuncional de múltiplos órgãos) em 5% (25).

A faixa etária afetada predominantemente é a meia-idade e o idoso (mediana: 47 anos; intervalo: 30-79 anos), com muitos poucos casos relatados entre crianças (0,9-2%). Os idosos são mais severamente afetados e apresentam maior

mortalidade (8-15%) (26).

A maioria dos estudos mostraram que os sintomas mais comuns da COVID-19 são febre (83-98%), fadiga (70%), tosse seca (59%), anorexia (40%), mialgia (35%), dispneia (31%) e produção de escarro (27%). A febre na COVID-19 foi descrita como baixa (temperatura axilar > 37,5°C), intermitente e de duração prolongada (até aproximadamente 14 dias). Em um estudo de 1099 pacientes, apenas 43,8% tiveram febre na admissão e 88,7% tiveram durante a hospitalização (19). Foram relatadas dores de cabeça, confusão, rinorréia, dor de garganta, hemoptise, vômito e diarreia, mas são menos comuns (< 10%) (27, 28). Algumas pessoas apresentaram sintomas gastrointestinais, como diarreia e náusea antes do desenvolvimento de febre e sinais e sintomas do trato respiratório inferior (29).



Curso Clínico da COVID-19 – Inicialmente fadiga, febre baixa intermitente de duração prolongada, mialgia e tosse seca. Pode melhorar ou piorar e progredir para dispnéia e tosse produtiva (aproximadamente 6 dias). O tempo médio de internação, desenvolvimento da Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e necessidade de ventilação mecânica e cuidados na UTI foi de 8, 8,2 e 10 dias, respectivamente.

Fonte: Sharma, R., Agarwal, M. and Saxena, S.K., *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Medical Virology: from Pathogenesis to Disease Control, Chapter 6: Clinical Characteristics and Differential Clinical Diagnosis of Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* Springer Nature Singapore Pte Ltd. (Referência 22)

Vários estudos relataram que os sinais e sintomas do COVID-19 em crianças são semelhantes aos adultos e geralmente são mais leves em comparação aos adultos (30,31).

Estudos epidemiológicos observaram a transmissão de SARS-CoV-2 durante o período de incubação pré-sintomático (32, 33), acreditando-se também que ocorra a transmissão assintomática (34).

Entretanto, o grau exato de derramamento de RNA viral de SARS-CoV-2 que confere risco de transmissão ainda não está claro. Acredita-se que o risco de transmissão seja maior quando os pacientes são sintomáticos, pois o derramamento viral é maior no momento do início dos sintomas e diminui ao longo de vários dias a semanas (35). No entanto, a proporção de transmissão de

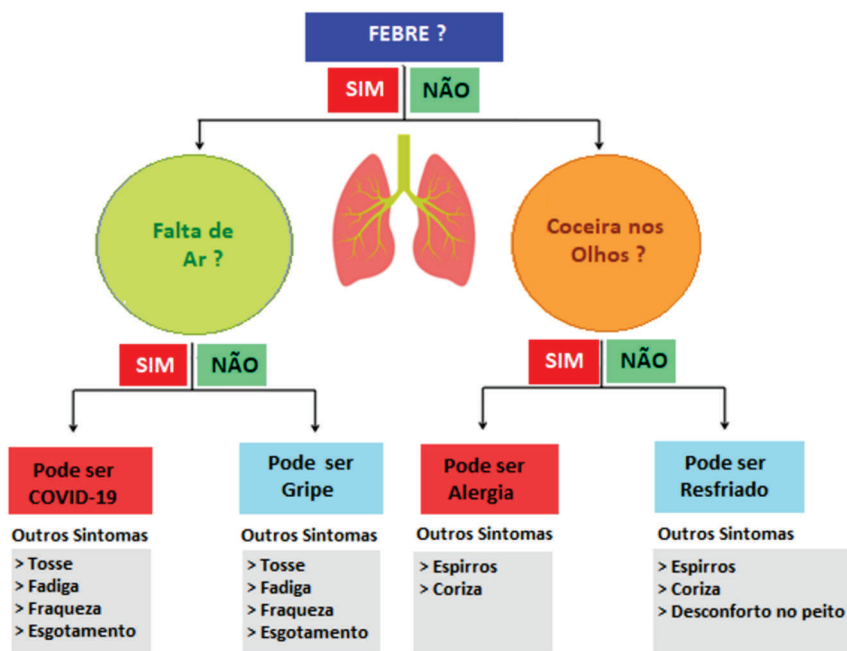
SARS-CoV-2 na população devido a infecção assintomática ou pré-sintomática em comparação com infecção sintomática não é clara (36).

A idade é um forte fator de risco para doença grave, complicações e morte (37, 38). Dados epidemiológicos dos EUA sugerem que a fatalidade foi maior em pessoas com idade ≥ 85 anos (10% a 27%), seguida por 3% a 11% nas idades de 65 a 84 anos, 1% a 3% nas idades de 55 a 64 anos e < 1% para as idades de 0 a 54 anos (39).

A existência de comorbidades é fator importante para pacientes que evoluem para o óbito, sendo que vários estudos mostram que doenças cardíacas, hipertensão, acidente vascular cerebral prévio, diabetes, doença pulmonar crônica e doença renal crônica foram associadas ao aumento da gravidade da doença e a resultados adversos (40, 41).

Foi relatada infecção de SARS-CoV-2 com outros vírus respiratórios, e a detecção de outro patógeno respiratório não exclui COVID-19 (42).

FLUXOGRAMA DOS SINTOMAS GERAIS DA COVID-19 E DE QUADROS SEMELHANTES - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL (22)



Fonte: Sharma, R., Agarwal, M. and Saxena, S.K., *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Medical Virology: from Pathogenesis to Disease Control, Chapter 6: Clinical Characteristics and Differential Clinical Diagnosis of Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* Springer Nature Singapore Pte Ltd. (Referência 22)

BREVE REVISÃO SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imune é o conjunto de células, tecidos, órgãos e moléculas que o organismo humano e de outros seres vivos usam para a eliminar os agentes ou moléculas estranhas, com a finalidade de manter a homeostasia do organismo.

Os mecanismos fisiológicos do sistema imune consistem numa resposta coordenada dessas células e moléculas diante dos organismos infecciosos, o que leva ao aparecimento de respostas específicas e seletivas, inclusive com memória imunitária, que também pode ser criada artificialmente, através das vacinas. Na ausência de um sistema imune funcional, infecções leves podem sobrepujar o hospedeiro e levá-lo a morte.

Entretanto, mesmo com um sistema imune funcional, a resposta imune específica a um agente infeccioso leva tempo para se desenvolver e, os organismos estranhos, desenvolvem mecanismos de evasão para fugir da resposta imune.

Há dois tipos de imunidade (Figura 4):

Imunidade Inata: que não necessita de exposição anterior ao antígeno, ou seja, memória imunitária para ser eficaz, e responde imediatamente ao invasor; são as células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células linfoides inatas (*natural killer* – NK), leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), e

Imunidade Adaptativa (Adquirida): que requer exposição anterior ao antígeno, e, portanto, leva tempo para se desenvolver após o primeiro contato com um agente invasor. Entretanto, no segundo contato, a resposta é rápida. O sistema recorda a exposição anterior e é específica ao antígeno; representada pelos linfócitos T e B. Portanto, uma característica particular da resposta adaptativa é que ela deixa memória.

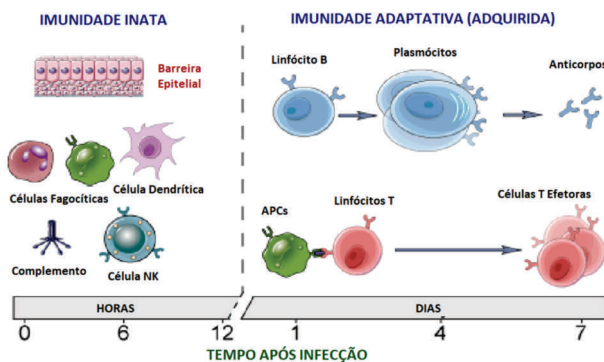


Figura 4. A resposta da imunidade inata é em horas, enquanto a da imunidade adquirida é em dias. APCs – células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas).

Fonte: M. Carrie Miceli: *Basic Immunology: Self Non-Self Discrimination for Defense, Self-Tolerance, and Regeneration*

Assim, as células dendríticas e macrófagos fagocitam patógenos, digerem e apresentam seus epítopos aos linfócitos T e B, ativando a imunidade celular (linfócitos T) e humoral (linfócitos B), iniciando a resposta imune contra o agente infeccioso.

A célula que recebe as informações do agente invasor são os linfócitos T CD4, também chamado linfócito “*helper*” (T_H) ou auxiliar. Eles se diferenciam em:

- T_{H1} - que promovem a imunidade mediada por células T citotóxicas ou supressoras (linfócito T CD8) e, portanto, estão particularmente envolvidos na defesa contra patógenos intracelulares (p. ex., vírus).
- T_{H2} - que promovem a produção de anticorpos por linfócitos B (imunidade humoral) e, portanto, estão particularmente envolvidos no direcionamento de respostas cujo alvo são agentes patogênicos extracelulares (p. ex., bactérias, parasitas).
- T_{H17}: que promovem a inflamação nos tecidos.

Os linfócitos *natural killer* (NK) pertencem a uma categoria de células denominadas células linfoides inatas. As células NK representam 5 a 15% das células mononucleares do sangue periférico. Elas lisam células tumorais (estranhas) ou infectadas por vírus sem que estas expressem algum antígeno ativador da resposta imune específica. As células NK também podem secretar várias citocinas (p. ex., IFN gama, IL-1, FNT alfa).

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*), que nos seres humanos recebe o nome de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA – *Human Leukocyte Antigen*), representa a compatibilidade ou equivalência entre células, tecidos e órgãos. Ele pode ser dividido em 2 classes:

1. MHC (HLA) Classe I: está presente em todas as células nucleadas, com exceção dos neurônios, células testiculares e intraoculares. Apresentam antígenos que são processados no citoplasma da célula, para os linfócitos T CD8 que têm função citotóxica. Assim, um vírus que está parasitando uma célula será reconhecido pelos linfócitos T CD8, o qual destruirá a célula infectada.

2. MHC (HLA) Classe II: está somente presente na superfície de células apresentadoras de antígenos, ou seja, macrófagos circulantes e teciduais, linfócitos B e células dendríticas. Apresentam fragmentos de antígenos fagocitados

por essas células ao linfócito T CD4, os quais desencadearão a resposta imunológica.

RESPOSTA IMUNE AO SARS-CoV-2

Após a entrada no hospedeiro, o vírus se liga a receptores específicos e invade a célula para se replicar. Uma vez que o vírus está dentro da célula, como as células epiteliais respiratórias no caso da SARS-CoV-2, os peptídeos virais são apresentados através de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I às células T citotóxicas CD8. Essas células são então ativadas e começam a mostrar expansão clonal e desenvolver linfócitos T citotóxicos efetores e de memórias específicas para o vírus. As células T citotóxicas CD8 lisam as células infectadas pelo vírus. O vírus e suas partículas são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos, tais como células dendríticas e macrófagos, as quais apresentam peptídeos virais para os linfócitos T CD4 através de moléculas MHC de classe II (43). Esses linfócitos T CD4 (T_H2) ativam linfócitos B, os quais respondem produzindo uma resposta específica ao vírus através de anticorpos IgM na primeira semana após o início dos sintomas (44). Os anticorpos IgG seguem a resposta de IgM e, provavelmente, estabelecem imunidade ao longo da vida.

Para que a resposta antiviral seja apropriada, é necessário a participação ativa e proporcional de linfócitos T citotóxicos (CD8) e células natural killer (NK) (45). Além disso, os linfócitos T CD8 de memória são capazes de fornecer proteção contra infecções futuras. Assim, a combinação de T CD8 e anticorpos específicos contra o vírus pode oferecer imunidade protetora ideal contra o SARS-CoV-2 (46).

Na COVID-19, embora a maioria dos pacientes evoluem satisfatoriamente, alguns mostram acentuada diminuição de células T CD8 e NK ocasionada por incidente linfopenia, sendo esta um importante achado patológico e critério de gravidade. Assim, a porcentagem de linfócitos

é sugerida como um biomarcador preditivo de gravidade ou recuperação da doença, cujo mecanismo permanece incerto (47), conforme pode ser interpretado no Quadro 1.

Porcentagem de Linfócitos no Sangue	1ª Determinação 10 – 12 dias após o início dos sintomas	2ª Determinação 17 – 19 dias após o início dos sintomas
> 20%	Leve / Moderado	Recuperando
5 – 20%	Grave	Risco
< 5%	Grave	Paciente em estado crítico

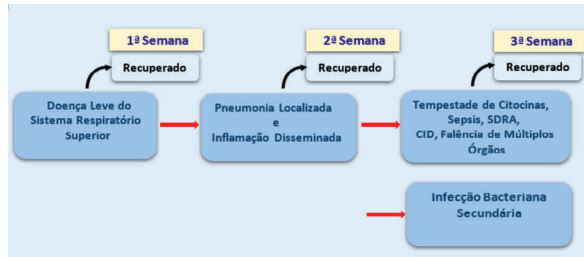
Quadro 1- Prognóstico da covid-19 baseado em porcentagem de linfócitos (47)

Os eosinófilos também participam da imunidade adaptativa, servindo como células apresentadoras de antígeno, como demonstrado, *in vivo* e *in vitro*, com alguns vírus respiratório, incluindo o vírus sincicial respiratório (RSV) e influenza (48). Há correlação entre as contagens de eosinófilos e linfócitos entre pacientes graves e não graves em ambiente hospitalar, sugerindo que a contagem de eosinófilos abaixo dos níveis normais poderia ser biomarcador de diagnóstico de pneumonia por COVID-19, uma vez que estudo demonstrou que 70% de pneumonia por COVID-19 apresentaram eosinopenia e somente 16,7% de pneumonia por outras causas virais tiveram contagem de eosinófilos diminuída (49).

A resposta imune é crucial para eliminar o vírus invasor, mas uma resposta imune antiviral persistente também pode causar produção maciça de citocinas inflamatórias e danos aos tecidos do hospedeiro (50). Assim, pode-se postular que quando alguém com uma resposta imune potente encontra o vírus SARS-CoV-2, uma forte ativação de respostas imunes inatas e adaptativas locais mantém a viremia sob controle, levando a uma baixa inflamação e recuperação sistêmica. Por outro lado, em indivíduos com uma resposta imune defeituosa, devido à idade ou comorbidades, a replicação viral irrestrita leva a altas concentrações de vírus, o que, por sua vez, desencadeia hiperinflamação e complicações graves, como Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e morte (51).

Os pacientes que evoluem para pneumonia grave, geralmente na segunda semana do início dos sintomas, podem desenvolver uma

“tempestade de citocinas”, SDRA, falência de vários órgãos e coagulação intravascular disseminada (CIV) na terceira semana do início da sintomatologia (Quadro 2).



Quadro 2 – Evolução Clínica na COVID-19

Fonte: Azkur, A.K., Akdis, M., Azkur, D., Sokolowska, M. et al., *Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19*. *Europ J Allergy and Cl Immunol*. 5, 2020 doi: 10.1111/ALL.14364 (Referência 49).

TEMPESTADE DE CITOQUINAS

Embora estudos observacionais tenham relatado idade avançada e presença de comorbidades como fatores de risco para aumento da gravidade da doença em pacientes com COVID-19, está claro que a doença grave também pode ocorrer em pacientes mais jovens e sem doenças pré-existentes (52).

Níveis mais altos de marcadores inflamatórios no sangue (incluindo proteína C-reativa, ferritina e D-dímeros), aumento da proporção de neutrófilos/linfócitos (53, 54) e aumento dos níveis séricos de várias citocinas e quimiocinas inflamatórias (55, 56) foram associados à gravidade e morte pela COVID-19.

A Síndrome de Liberação de Citocinas (CLS) é uma condição inflamatória sistêmica com risco de vida, tipicamente associada a medicamentos biológicos, mas também ocorrendo durante a resposta a algumas infecções (57, 58). Essa síndrome é o resultado de uma tempestade de citocinas.

Os perfis sistêmicos de citocinas observados em pacientes com COVID-19 grave mostram semelhanças com os observados nas síndromes de liberação de citocinas, como a

síndrome de ativação de macrófagos, com aumento da produção de IL-6, IL-7, IL-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interferon-gama (IFN- γ) e também de quimiocinas inflamatórias. Portanto, pacientes com infecção viral são particularmente suscetíveis à síndrome do desconforto respiratório agudo e falência de múltiplos órgãos (Figura 5). Tempestade de citocinas e baixos linfócitos também são específicos em outras doenças graves pelo coronavírus (como SARS e MERS) e estão positivamente relacionadas à progressão e gravidade da doença (56). Acredita-se também que a ativação desregulada do compartimento de fagócitos mononucleares contribui para a hiperinflamação associada a COVID-19 (59).

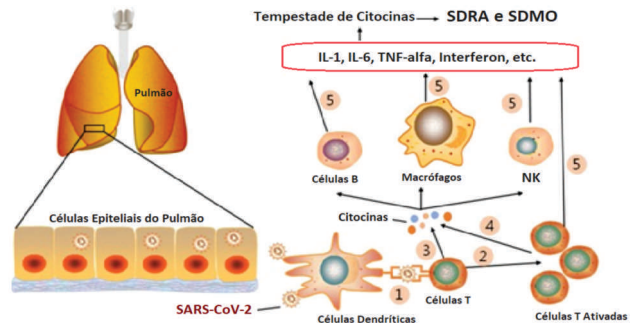


Figura 5. Mecanismo da tempestade inflamatória. 1. Apresentação do antígeno por células dendríticas. 2. As células T são ativadas e começam a se reproduzir. 3. Uma grande quantidade de citocina é secretada durante a ativação das células T. 4. As células T ativadas liberam citocina e estas ativam células B, macrófagos e células NK. As citocinas são secretadas. A tempestade de citocinas leva a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e a Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO).

Fonte: Zhang, Y., Geng, Tan, Y., *New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system*, *Biom and Pharm*, 127, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110195> (Referência 102).

Também foi proposto um papel biológico relevante para a ferritina em condições relacionadas à SLC, bem como em doenças autoimunes. A presença de hiperferritinemia é, de fato, uma característica bem conhecida em pacientes com diferentes condições auto-imunes, como artrite reumatóide (AR), lúpus eritematoso sistêmico (LES) e síndrome antifosfolípida (57). A ferritina também pode ser uma molécula de sinalização pró-inflamatória, e a hiperferritinemia tem sido associada a diferentes condições

relacionadas à SLC, como a síndrome de ativação de macrófagos e choque séptico (57), uma vez que, a síntese de ferritina é mediada, não apenas pela disponibilidade de ferro, mas também por IL-1, IL-6 e TNF (60), que são super expressados durante a SLC.

Nos pacientes com SARS-CoV-2 com pior prognóstico, IL-6, IL-10 e TNF- α aumentam rapidamente e atingem níveis elevados. Por outro lado, em pacientes com sintomas mais leves, essas citocinas atingem níveis mais baixos, com sua expressão aumentando na fase de doença e diminuindo durante a fase de recuperação (61).

Vários estudos demonstraram que a disfunção da coagulação existe em pacientes com grave pneumonia por coronavírus (62,63), o que está claramente correlacionado com um mau prognóstico (63). Os parâmetros de coagulação convencionais de pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) foram significativamente maiores do que aqueles de pacientes não internados em UTI (64).

Pacientes com infecção grave têm maior probabilidade de ter coagulopatia associada ao COVID-19 do que pacientes com infecção leve, e aqueles que morrem de COVID-19 são mais propensos a atender aos critérios da *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) para Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD) em comparação com os sobreviventes (63, 65).

A ativação da coagulação e da CIVD é uma característica da lesão de órgãos na sepse, onde é principalmente mediada por citocinas inflamatórias (66).

A ativação de monócitos sanguíneos induz a expressão do fator tecidual (Fator III da coagulação). As células endoteliais são ativadas por citocinas e partículas virais e acarretam dano endotelial, expondo o fator tecidual. O fator tecidual expresso pelos monócitos ativados, microvesículas derivadas de monócitos e células endoteliais, ativa a via de coagulação extrínseca, levando à deposição de fibrina e coagulação do sangue (65). Além disso, as principais vias dos anticoagulantes naturais, como a antitrombina ou o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), quase

sempre são prejudicadas durante a inflamação, contribuindo ainda mais para a propagação da coagulação (65).

Portanto, a inflamação associada a COVID-19 e subsequente ativação da coagulação é a causa provável dos níveis elevados de D-dímero, onde a infecção é uma etiologia importante (67).

Assim, pacientes hospitalizados com infecção pela COVID-19 devem realizar testes de coagulação na admissão, incluindo D-dímero, TP, TTPa, fibrinogênio e contagem de plaquetas, os quais são testes que podem fornecer informações prognósticas úteis. O aumento do D-dímero associado aos não sobreviventes e a rápida queda no fibrinogênio associado a CIVD podem ser observados 7 a 11 dias após o início dos sintomas (54, 63, 68). Elevado D-dímero, TP e TTPa, com diminuição da contagem de fibrinogênio e plaquetas, também coincide com a duração da hospitalização, começando claramente entre 7 a 10 dias após a internação, embora o aumento do D-dímero possa iniciar a partir do 4º dia (70).

Resumindo (70):

1. A coagulopatia se manifesta com fibrinogênio e D-dímeros elevados, e alteração mínima no TP, TTPa e contagem de plaquetas nos estágios iniciais da infecção.

2. Os níveis crescentes de IL-6 estão correlacionados com o aumento dos níveis de fibrinogênio.

3. A coagulopatia parece estar relacionada à gravidade da doença e consequente inflamação da tromboinfecção e não à atividade viral intrínseca.

4. D-dímero elevado na admissão está associado ao aumento da mortalidade (69).

5. O aumento do D-dímero após a admissão precede à disfunção de múltiplos órgãos e a CIVD.

6. Manifestações de sangramento não são comuns, apesar da coagulopatia.

A Figura 6 abaixo resume os principais marcadores bioquímicos e hematológicos de progressão da COVID-19 e de sua severidade (105).

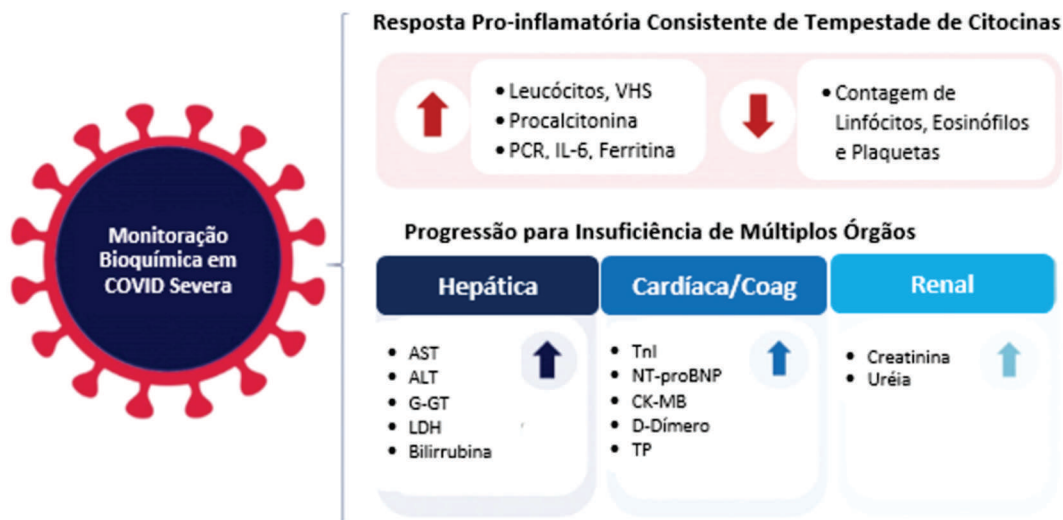


Figura 6. Marcadores bioquímicos e hematológicos da progressão da COVID-19.

Fonte: Bohn et al.: *Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19*. Clin Chem Lab Med 2020. (Referência 105)

Vale ressaltar também, que o envolvimento renal é comum em pacientes com COVID-19, os quais podem apresentar proteinúria na admissão hospitalar, enquanto a lesão renal aguda frequentemente se desenvolve em estágios posteriores em pacientes críticos e é reconhecida como um marcador de disfunção de múltiplos órgãos e gravidade da doença (71). A causa do comprometimento renal é, provavelmente, multifatorial, devido a comorbidade cardiovascular e predisponentes, como sepse, hipovolemia e nefrotoxinas. A insuficiência ventricular direita secundária à pneumonia por COVID-19, pode levar a congestão renal e consequente insuficiência renal aguda. Da mesma forma, a disfunção ventricular esquerda leva a baixo débito cardíaco, subenchimento arterial e hipoperfusão renal (71) (Figura 7).

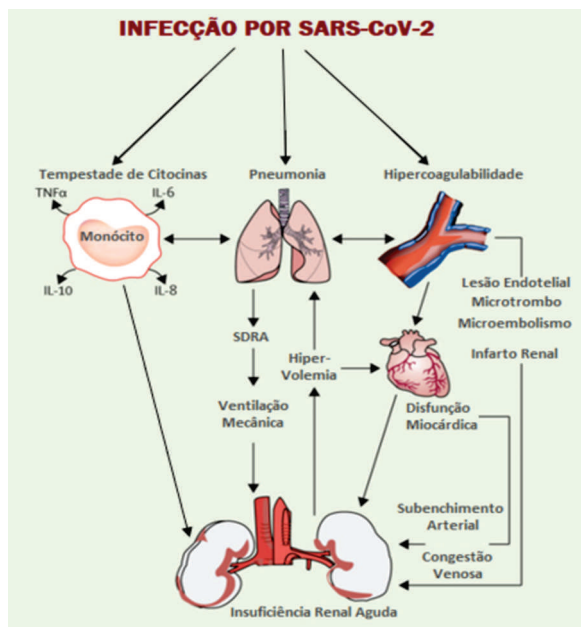


Figura 7. Insuficiência renal aguda na COVID-19. Possíveis consequências hemodinâmicas, pró-inflamatórias e pró-apoptóticas da inflamação pulmonar, síndrome de liberação de citocinas e hipercoagulabilidade na função renal.

Fonte: Ronco, C., Reis, T., Husain-Syed, F., *Management of acute kidney injury in patients with COVID-19*. Lancet Respir Med, 5, 2020 [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30229-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30229-0) (Referência 71)

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA COVID-19

Várias linhas de evidências contribuem para demonstrar que o diagnóstico etiológico da infecção por SARS-CoV-2 não será possível sem testes laboratoriais, seja pela identificação direta da presença do vírus em amostras biológicas com testes moleculares, seja por meio da resposta imunológica contra o vírus através da identificação de anticorpos específicos. A enorme discussão movida dentro da área médica especializada, bem como fora dela, incluindo aí os vários setores de representatividade da sociedade, em face dos interesses envolvidos, motivados por índices econômicos desastrosos e óbitos em escala crescente, além da exigência de retaguarda hospitalar adequada e suficiente, reconheceu ser a medicina laboratorial fundamental na estratificação de risco pela disponibilidade de muitos testes, como contagem de células sanguíneas e biomarcadores inflamatórios, cardíacos, musculares, hepáticos, renais e hemostáticos, os quais são elementos essenciais para identificar um subconjunto de pacientes com risco aumentado de desenvolver as complicações mais graves da COVID-19, como a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), síndrome da resposta inflamatória severa (SRIS) e insuficiência de múltiplos órgãos (72, 73).

Dentro deste contexto, utilizar as ferramentas laboratoriais disponíveis para a identificação de portadores sintomáticos e assintomáticos, para o rastreamento de cadeias de infecção, identificando infecções persistentes ou passadas, para o rastreamento de pessoas potencialmente imunizadas, que não desenvolveram sintomas, o que contribui para diferenciar as pessoas ainda em risco, bem como para auxiliar na decisão no momento da liberação de pacientes da assistência médica e nos estudos epidemiológicos da população, dão ao laboratório o reconhecimento de seu verdadeiro papel de especialidade médica participante na promoção da saúde.

Assim, o conhecimento das características

de cada teste, sua aplicação e interpretação de seus resultados tornam-se ferramentas extremamente úteis para a tomada de decisão e implementação de medidas coerentes e adequadas aos objetivos propostos. Conhecer se o teste detecta a infecção diretamente (o próprio vírus) ou indiretamente (anticorpos do hospedeiro), o tempo de resposta do teste, a capacidade de realizar vários testes ao mesmo tempo, a necessidade de número mínimo de amostras e a funcionalidade na aplicação do teste em ambientes com pouca infraestrutura, são elementos necessários para a correta aplicação e interpretação de seus resultados.

O *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA classifica os testes de diagnóstico por sua complexidade: os testes descartáveis são os disponíveis para uso no ponto de atendimento, enquanto os testes de complexidade moderada e alta devem ser realizados em laboratório.

Em geral, os ensaios atualmente disponíveis para COVID-19 podem ser classificados em dois grupos:

- O primeiro grupo, de testes virológicos, inclui testes que podem detectar a presença dos componentes do vírus (material genético ou antígenos). Esses testes podem confirmar o diagnóstico de pacientes com sintomas compatíveis com COVID-19, detectar infecções em populações com alto risco de infecção (como profissionais de saúde) ou gravidade (hipertensão, diabetes, obesidade, história cardiovascular, respiratória crônica, imunossupressão, câncer, etc.) e avaliar se um indivíduo recuperado da COVID-19 ainda pode ser infeccioso.
- O segundo grupo de testes, sorológicos, detecta anticorpos, IgM e/ou IgG, gerados como parte da resposta imune do indivíduo contra o vírus SARS-CoV-2, ou seja, indicam contato anterior ou em andamento. A imunidade (“proteção”) conferida pelos anticorpos ainda está sob investigação. Uma vez disponíveis evidências suficientes, os testes sorológicos seriam, juntamente com detecção direta do vírus, uma ferramenta

essencial no desenvolvimento de estratégias que permitam o relaxamento das medidas atuais de saúde pública.

A interpretação adequada dos resultados obtidos em qualquer tipo de ensaio deve ser realizada com cuidado e considerando a dinâmica da infecção (quando a amostra é coletada e a qualidade dessa amostra) e o objetivo para o qual a amostra é coletada (diagnóstico, soroprevalência, etc.).

TESTE MOLECULAR RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica laboratorial de rotina usada para amplificar pequenas amostras de DNA em quantidades maiores que podem ser detectadas e analisadas.

Para vírus de RNA, como SARS-CoV-2, a reação em cadeia da polimerase é precedida de uma etapa adicional para produzir um modelo de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA, pela adição de uma enzima chamada transcriptase reversa, daí a Transcrição Reversa-PCR (RT-PCR).

A PCR começa então pela adição de sequências curtas de DNA conhecidas como iniciadores, que se ligam às cadeias virais de DNA. A seção de fita dupla do DNA é então reconhecida e ligada por uma enzima polimerase termoestável que atua como uma fotocopiadora molecular para estender a sequência e produzir uma fita complementar completa.

Controlando as etapas de anelamento (recozimento), extensão e desnaturação com mudanças de temperatura, a amostra inicial de DNA viral pode ser amplificada exponencialmente, seguida pela adição de sondas de DNA específicas que produzem um sinal detectável (geralmente fluorescente) para confirmar o agente etiológico (Figura 8).

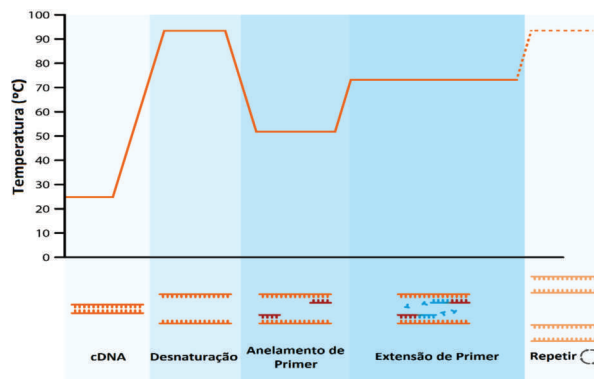


Figura 8. Diagrama mostrando os principais estágios da reação em cadeia da polimerase. Uma vez gerado, um modelo de cDNA é adicionado a um termociclador, juntamente com nucleotídeos livres, iniciadores e polimerase Taq (enzima termoestável). O dsDNA é desnaturado com calor para criar cordões únicos. A temperatura é então baixada para permitir que os iniciadores emparelhem sequências de DNA complementares. Ao elevar a temperatura mais uma vez, a polimerase Taq termoestável pode catalisar a adição de nucleotídeos a crescentes fitas de DNA complementares.

Embora a dinâmica da infecção, incluindo a secreção viral em diferentes fluidos, ainda esteja em estudo, até o momento foi possível estabelecer que o vírus pode ser detectado pelo menos 48 horas antes do início dos sintomas (casos pré-sintomáticos) e até 12-14 dias (média de 6-7 dias) depois, em amostras do trato respiratório superior (*swabs* naso/orofaríngeos), e até 20 dias ou mais em amostras do trato respiratório inferior, incluindo escarro, aspirado traqueal e lavagem bronqueoalveolar (74, 75, 76).

A precisão diagnóstica de muitos testes de RT-PCR atualmente disponíveis para a detecção de SARS-CoV-2 pode ser menor que o ideal (77, 78). A coleta da amostra é o fator preanalítico mais importante para se evitar resultados falsos negativos, e o RT-PCR não mostra sensibilidade totalmente satisfatória quando a amostra é obtida do trato respiratório superior (79, 80). Estudo com 205 pacientes com infecção por COVID-19 confirmada, mostrou que a positividade do RT-PCR foi maior em amostras de lavado broncoalveolar (93%), seguidas de escarro (72%), *swab* nasofaríngeos (63%) e *swab* orofaríngeos (32%) (81). Os resultados falsos negativos ocorreram principalmente pelo momento

inadequado da coleta das amostras em relação ao início da doença e à deficiência na técnica da coleta, especialmente nos *swabs* do naso e orofaríngeos. A heterogeneidade do material da amostra respiratória e a localização anatômica da amostra a ser coletada afetam a sensibilidade dos testes de ácido nucléico viral para SARS-CoV-2 (82). Há relatos em que a associação da RT-PCR com o teste sorológico pode melhorar a detecção de casos, com sensibilidade e especificidade próximas a 100%, quando realizadas por 7 ou mais dias a partir do início dos sintomas (83). Nesta mesma publicação de Zhao, pode-se observar que nos 7 primeiros dias da sintomatologia, o teste de RNA apresentou maior sensibilidade (66,7%), enquanto os testes de anticorpos mostraram taxas de positividade de 38,3%. Entretanto, a partir do 8º dia, a taxa de sensibilidade dos anticorpos foi superior às do teste de RNA, bem como do 15º ao 39º dia o RNA foi detectável em apenas 45,5% das amostras, enquanto a presença de anticorpos era próxima de 100%.

O fato do teste de RT-PCR poder ser inicialmente negativo em pacientes com infecção por SARS-CoV-2 pode estar relacionado a cinética provável da infecção, ou seja, a intensidade da carga viral pode afetar a sensibilidade analítica dos testes moleculares utilizados atualmente. Assim, pode ser identificada duas zonas cinzentas potencialmente responsáveis pela falsa negatividade atribuível à baixa carga viral. A primeira corresponderia à fase inicial da infecção, quando o paciente ainda está completamente assintomático ou apenas levemente sintomático. O derramamento de vírus pode ter sido iniciado, mas sua carga é baixa para ser identificada por alguns ensaios de RT-PCR (Figura 9). A segunda refletiria a cauda da infecção por SARS-CoV-2, quando já há alívio dos sintomas. Nesta fase, o derramamento viral ainda persiste, embora permaneça abaixo da sensibilidade analítica de alguns ensaios de RT-PCR (84).

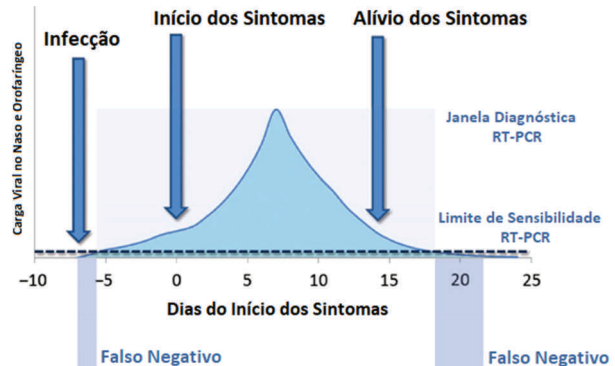


Figura 9. Correspondência entre desenvolvimento da carga viral durante infecção por SARSCoV-2, síndrome clínica aguda grave, curso clínico e positividade de ensaios em tempo real de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (rRT-PCR).

Fonte: Lippi, G., Simundic, A.M. and Plebani, M., *Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19)*. Clin Chem. Lab Med., 58 (7), 2020 (Referência 84).

Portanto, um resultado negativo no teste de RT-PCR não descarta completamente a infecção por SARS-CoV-2 e não deve ser usado como elemento único para o gerenciamento das decisões clínicas e o reteste deve ser sempre considerado (85).

TESTES DE PESQUISA DE ANTÍGENO VIRAL

A partir das informações recuperáveis da literatura e de outras fontes, os testes atuais de antígeno, até o momento, não são acompanhados de provas suficientes de suas características de desempenho, tais seja esse o fator de tão poucos testes disponíveis comercialmente.

Seu uso pretendido é o de reduzir o número de testes de RT-PCR, uma vez ser de fácil execução, utilização no ponto de atendimento (POC) e rápida obtenção de resultado. Entretanto, sua performance dependente de alta carga viral reduz muito sua sensibilidade, acarretando muitos resultados falsos negativos, exigindo confirmação com o RT-PCR quando o resultado é negativo (106).

TESTES SOROLÓGICOS

Os testes sorológicos para SARS-CoV-2 têm agora Autorização de Uso de Emergência (EUA) pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, que analisou independentemente seu desempenho. Não há vantagem identificada nos ensaios, se eles testam para IgG, IgM e IgG ou anticorpo total (86).

Os testes sorológicos para SARS-CoV-2 podem desempenhar um papel importante no entendimento da epidemiologia do vírus na população em geral e na identificação de grupos com maior risco de infecção. Diferentemente dos métodos de detecção direta viral, como testes de amplificação de ácido nucleico, que podem detectar pessoas com infecção ativa, os testes de anticorpos ajudam a determinar se o indivíduo que está sendo testado já foi infectado, mesmo que essa pessoa nunca tenha apresentado sintomas. Eles detectam a infecção pelo vírus SARS-CoV-2, indiretamente, em declínio ou progressa, medindo a resposta imune humoral do hospedeiro ao vírus. Portanto, os testes sorológicos normalmente não substituem os métodos de detecção direta como a principal ferramenta para diagnosticar uma infecção ativa por SARS-CoV-2, mas eles têm várias aplicações importantes no monitoramento e resposta à pandemia de COVID-19.

Eles podem ajudar a determinar a proporção de uma população previamente infectada por SARS-CoV-2 e fornecer informações sobre populações que “podem” estar imunes e potencialmente protegidas. Assim, os padrões demográficos e geográficos dos resultados dos testes sorológicos podem ajudar a determinar quais comunidades podem ter experimentado uma maior taxa de infecção e, portanto, podem ter maiores taxas da chamada “imunidade de rebanho”. Em alguns casos, os resultados dos testes sorológicos podem ajudar a identificar pessoas potencialmente infectadas com SARS-CoV-2 e determinar quem pode se qualificar para doar sangue, que pode ser usado na fabricação de plasma convalescente para um possível uso no tratamento de pacientes gravemente enfermos com COVID-19 (86).

ALVOS ANTIGÊNICOS E CINÉTICA DOS ANTICORPOS

Os dois principais alvos antigênicos do vírus SARS-CoV-2 contra os quais os anticorpos são dirigidos são a glicoproteína Spike (S) e a fosfoproteína do nucleocapsídeo (N). Enquanto a proteína S é essencial para a entrada do vírus na célula hospedeira e está presente na superfície viral, a proteína N é a proteína imunodominante mais abundantemente e que interage com o RNA viral. Múltiplas formas de proteína S, comprimento total (S1 + S2) ou parcial (domínio S1 ou domínio de ligação ao receptor (RBD)), são usadas como antígenos. O alvo da proteína determina a reatividade cruzada e a especificidade, porque N é mais conservada nos coronavírus que S, e, dentro de S, o RBD é mais conservado que S1 ou S total, portanto, essas características de conservação dessas proteínas entre os vários tipos de coronavírus são responsáveis pelas reações cruzadas nos testes sorológicos, causando, algumas vezes, falsos resultados positivos.

Assim, testes que detectam anticorpos para N seriam os mais sensíveis. No entanto, o domínio de ligação ao receptor da proteína S (RBD-S) e os anticorpos para o RBD-S seriam mais específicos, e espera-se que sejam neutralizantes. Portanto, o uso de um ou de ambos os antígenos para detectar IgG e IgM resultaria em alta sensibilidade (87). Estudo também tem mostrado ser a proteína N o melhor candidato ao diagnóstico precoce, devido à sua alta imunogenicidade e acúmulo intracelular antes do empacotamento viral (88). Entretanto, a imunidade protetora é realizada apenas pela proteína S, que mostrou altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o SARS-CoV-1, o que não foi observado com a proteína N (89).

Há também padrões diferentes na cinética de anticorpos entre pacientes graves, internados em UTI, e não graves (fora de UTI). Nestes últimos, os anticorpos IgM atingiram um pico na segunda semana após o início dos sintomas, declinando na terceira semana, enquanto a IgG iniciou sua soroconversão na segunda semana e continuou a aumentar na terceira semana (76, 83, 89). Já nos

pacientes em UTI os níveis de IgM mostram comportamento irregular, uma vez que são baixos, na sua grande maioria (63,6%), ou elevados em 36,3%, e a IgG foi elevada em todos os pacientes, excedendo a IgM na segunda semana após o início dos sintomas (89).

A sorologia também é importante para pacientes com cargas virais muito baixas, ou seja, abaixo do limite de detecção dos testes de RT-PCR (Figura 10). Entretanto, como a maioria dos pacientes apresentam concentrações de anticorpos crescentes após 10 dias do início dos sintomas, a coleta de amostras seriais de soro na fase de convalescência seria mais útil (87). As quantidades séricas de IgG podem aumentar ao mesmo tempo ou mais cedo que a IgM anti-SARS-CoV-2, sendo que a soroconversão precoce de IgG em relação a IgM pode estar relacionada à sensibilidade do teste sorológico (80, 87).

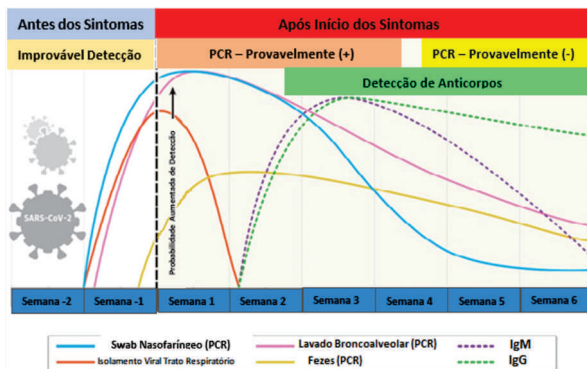


Figura 10. Intervalos de tempo estimados e as taxas de detecção viral são baseados em dados de vários relatórios publicados. Devido à variabilidade nos valores entre os estudos, os intervalos de tempo estimados devem ser considerados aproximações.

Fonte: Sethuraman, N. et al., *Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2*. JAMA, Published online May 6, 2020 (Referência 75).

Apesar da resposta imune e da cinética de anticorpos esperada na COVID-19 seja similar à de outras doenças virais já bastante conhecidas, estudos continuam e precisam ser realizados para que o esclarecimento sobre o comportamento do hospedeiro à infecção pelo SARS-CoV-2 seja totalmente elucidado. Artigo recente de Quan-Xin Long et al., publicado na revista *Nature Medicine*, estudando 37 indivíduos assintomáticos no distrito de Wanzhou que foram diagnosticados

com infecções por SARS-CoV-2 confirmadas por RT-PCR, mas sem sintomas clínicos relevantes nos 14 dias anteriores e durante a hospitalização, mostrou que a duração mediana do derramamento viral no grupo assintomático foi de 19 dias (intervalo interquartil (IQR), 15-26 dias), sendo esta significativamente maior do que no grupo sintomático, e que os níveis de IgG específicos para o vírus no grupo assintomático foram significativamente menores em relação ao grupo sintomático durante a fase aguda. Esses indivíduos assintomáticos, apresentaram redução nos níveis de IgG e de anticorpos neutralizantes durante a fase inicial da convalescência em comparação com os pacientes sintomáticos, sendo que 40% dos assintomáticos se tornaram soronegativos contra 12,9% do grupo sintomático (91). Além disso, indivíduos assintomáticos exibiram níveis mais baixos de 18 citocinas pró e anti-inflamatórias. Esses dados sugerem que indivíduos assintomáticos tiveram uma resposta imune mais fraca à infecção por SARS-CoV-2.

Embora a compreensão sobre o comportamento desta nova infecção viral seja ainda perseguida, o *Johns Hopkins Center for Health* conceitua que os testes de RT-PCR atualmente são usados para diagnosticar casos de COVID-19 indicando apenas a presença do material viral durante a infecção e não informa se uma pessoa foi infectada e subsequentemente recuperada. Já os testes sorológicos fornecem mais detalhes sobre a prevalência da doença na população, identificando indivíduos que desenvolveram anticorpos contra o vírus (92).

TIPOS DE TESTES SOROLÓGICOS

Diferentes tipos de ensaios podem ser usados para determinar diferentes aspectos da resposta imune e da funcionalidade dos anticorpos. Os testes podem ser amplamente classificados para detectar anticorpos de ligação.

Esses testes usam proteínas purificadas do SARS-CoV-2, não vírus vivo. Com reagentes específicos, anticorpos individuais, como IgG, IgM e IgA, podem ser determinados. Em geral, a IgM é um dos primeiros anticorpos produzidos após a

infecção e é mais útil para determinar a infecção recente, enquanto a IgG geralmente se desenvolve após a IgM e pode permanecer detectável por meses ou anos. A IgA é importante para a imunidade da mucosa e pode ser detectada em secreções mucosas como saliva, além do sangue, embora seu significado na COVID-19 ainda esteja por ser determinado (86). Dependendo da complexidade dos ensaios, esses testes podem ser realizados rapidamente (menos de 30 minutos) no ponto de atendimento ou em poucas horas em laboratório.

Os testes que detectam anticorpos de ligação se enquadram em duas grandes categorias:

1. Testes no Ponto de Atendimento (POC – *Point of Care*): utilizam metodologia de fluxo lateral, também conhecida como imunocromatografia, são também chamados de RDT (*Rapid Diagnostic Test*). Eles podem detectar IgG ou IgG e IgM, ou anticorpo total no soro, plasma, sangue total e/ou saliva (Figura 11). Uma vantagem desses testes é que alguns deles permitem ser realizados em amostras de sangue obtidas por punção digital em vez de punção venosa.

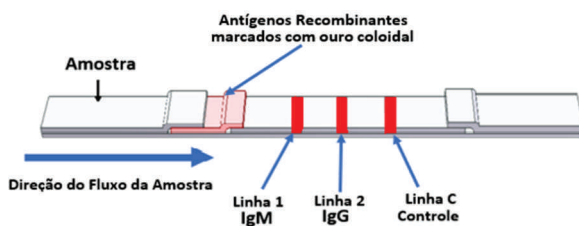


Figura 11. Desenho de um ensaio de fluxo lateral mostrando a direção do fluxo ao se dispensar a amostra, os antígenos recombinantes que se ligarão aos anticorpos (IgM e/ou IgG) quando presentes, a linha 1 teste que capturará os anticorpos IgM da amostra, se presentes, a linha 2 teste que capturará os anticorpos IgG da amostra, se presentes, e a linha C controle, cuja presença garante o correto funcionamento do teste.

2. Testes de Laboratório: utilizam a metodologia ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou CIA (*chemiluminescent immunoassay*) para detecção de anticorpos, exigindo profissionais qualificados e instrumentos específicos. Com base nos reagentes, IgG, IgM e IgA podem ser detectados separadamente ou combinados, como no caso de anticorpos total.

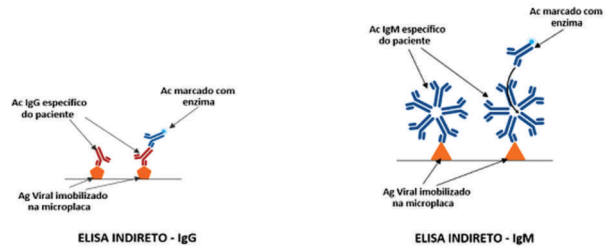


Figura 12. Os ELISAs Indiretos IgG e IgM detectam respostas de anticorpos IgG ou IgM a um antígeno específico e são um dos ELISAs mais simples. A placa é revestida com antígeno e a amostra do paciente é aplicada. A IgG ou IgM específica na amostra irá então ligar-se e ser detectada por anticorpos IgG ou IgM anti-humanos para produzir um sinal.

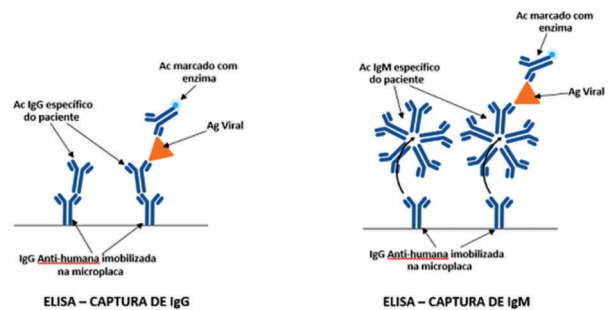


Figura 13. Nos ELISAs de captura de IgG e IgM, a microplaca é revestida com IgG anti-humana. Quando a amostra do paciente é adicionada, todos os anticorpos IgG ou IgM da amostra se ligam a eles. Em seguida, um antígeno específico é adicionado, o qual é “capturado” pela IgG ou IgM do paciente, se houver anticorpos IgG ou IgM específicos na amostra do paciente. A ligação do antígeno é então detectada com um anticorpo específico marcado com uma enzima (ou o antígeno pode ser diretamente marcado em alguns casos). Os ELISAs de captura de IgM são mais comumente usados, pois evitam a necessidade de remoção de IgG como nos ELISAs indiretos.

Os imunoenaios quimioluminescentes são variações de um ELISA padrão, onde uma enzima converte um substrato para que a reação emita luz em vez de desenvolver cor visível. Diferentes tipos de substratos são usados na quimioluminescência, onde os mais populares são o luminol ou seus derivados e o éster de acridina. A vantagem da quimioluminescência em relação ao ELISA é sua maior sensibilidade e especificidade, bem como maior linearidade e menos interferentes.

Ao contrário do material genético pesquisado nos testes moleculares, os anticorpos desenvolvidos contra um patógeno persistem na corrente sanguínea por muitos anos após a

infecção e variam em tipo e concentração de acordo com o estágio da infecção ou tempo após a exposição ao patógeno. Isso torna os testes sorológicos inestimáveis para o estudo da epidemiologia da doença ao longo de muitos anos e podem ser usados para estudar a prevalência de doenças presentes e passadas em diferentes populações ao longo do tempo. O ELISA e a quimioluminescência requerem equipamento e treinamento especializados em laboratório, enquanto o teste *Lateral Flow* é um imunoenensaio mais compacto e robusto e que vem sendo amplamente adotado como teste diagnóstico no ponto de atendimento (POC).

DESEMPENHO DOS TESTES SOROLÓGICOS

Como já comentado, a resposta imunológica varia entre indivíduos, conseqüentemente, o tempo para que a concentração dos anticorpos esteja em nível capaz de ser detectada pelo teste sorológico também é variável. Esta característica da sorologia traz bastante confusão na sua aplicação e interpretação dos resultados do teste. Assim, conhecer sobre as variáveis envolvidas em um teste sorológico, não só permite a escolha de um teste com melhor desempenho, como também auxilia na sua correta aplicação.

A sensibilidade e especificidade são medidas importantes de um teste diagnóstico, uma vez que nos dão ideia do desempenho do teste em comparação com o de um teste padrão ouro. Essas características são determinadas usando um conjunto definido de amostras negativas e positivas (93,97).

- **Sensibilidade:** é a proporção de indivíduos que têm a doença e apresentam teste positivo.
- **Especificidade:** é a proporção de indivíduos que não têm a doença e apresentam teste negativo.

Exemplo: Tabela 1

Resultado	RT-PCR		Total
	(+)	(-)	
TS (+)	a = 39	b = 20	a+b = 59
TS (-)	c = 8	d = 81	c+d = 89
Total	a+c = 47	b+d = 101	a+b+c+d = 148

Tabela 1. Desempenho do Teste Sorológico (TS) frente a RT-PCR, onde a = *verdadeiros positivos*, b = *falsos positivos*, c = *falsos negativos* e d = *verdadeiros negativos*.

$$\text{Sensibilidade} = a/(a+c) \rightarrow 39/(39+8) = 39/47 = 0,8297 \times 100 = \mathbf{82,97\%}$$

$$\text{Especificidade} = d/(b+d) \rightarrow 81/(20+81) = 81/101 = 0,8019 \times 100 = \mathbf{80,19\%}$$

No exemplo da Tabela 1, o número de verdadeiros positivos é 39 (a), que dividido pelo total de indivíduos com a doença ((a+c) = 47) resulta em 82,97%, o qual corresponde a *sensibilidade* do teste sorológico. Já o número de verdadeiros negativos é 81 (d), que dividido pelo total de indivíduos sem a doença ((b+d) = 101) resulta em 80,19%, o qual corresponde a *especificidade* do teste sorológico.

Há dois conceitos sobre sensibilidade e especificidade que precisamos entender. Um é a sensibilidade analítica do teste, ou seja, mede sua precisão ou a quantidade mínima detectável em um determinado sistema de análise. Portanto, a sensibilidade analítica mede a capacidade de se obter resultados positivos frente aos resultados positivos obtidos por um método de referência. Já a especificidade analítica é usada para medir o grau de reatividade cruzada em um sistema de análise. Portanto, a especificidade analítica mede a menor interferência de outras substâncias, sejam elas anticorpos ou antígenos que podem causar resultados positivos em indivíduos não doentes. O outro conceito é a sensibilidade clínica ou diagnóstica de um teste, a qual mede a porcentagem de amostras positivas em indivíduos infectados. Já a especificidade clínica ou diagnóstica mede a porcentagem de amostras negativas em indivíduos não infectados.

O teste ideal seria aquele que mostrasse uma sensibilidade e especificidade iguais a 100%. Na prática, no entanto, essa condição não é alcançada, e as tentativas de se aumentar a sensibilidade diagnóstica do teste resultam em

uma diminuição na sua especificidade, bem como o contrário também é verdadeiro. Este dilema pode ser ilustrado da seguinte maneira: Um médico que diz a todo paciente que o consulta, que ele ou ela está sofrendo de quadro gripal, alcançará a pontuação mais alta possível em relação à detecção de gripe, ou seja, 100%. No entanto, a especificidade diagnóstica de seu método de detecção é de 0%, pois nenhum dos pacientes sem gripe é por ele indicado como negativo. Assim que o médico tentar ser mais específico no diagnóstico dos pacientes, ele perceberá que sua sensibilidade diagnóstica diminui. Esse exemplo alerta-nos para que nunca devemos ficar satisfeitos com um teste com uma sensibilidade diagnóstica de 100%, sem conhecer sua especificidade diagnóstica.

Assim, o que devemos fazer quando é necessário escolher entre testes com diferentes valores para sensibilidade e especificidade para o diagnóstico? É necessário definir o objetivo da aplicação do teste. Se falsos resultados negativos não podem ser tolerados, mas falsos positivos são aceitáveis, como em bancos de sangue, por exemplo, deve-se utilizar testes de alta sensibilidade. Entretanto, nos casos em que a prevalência da doença é baixa, a alta especificidade diagnóstica é mais importante do que a sensibilidade, pois isso evitaria a obtenção de muitos resultados falsos positivos.

Também devemos estar atentos ao fato de que a sensibilidade de um teste pode variar em diferentes estágios da doença. Um teste que tem sensibilidade de 100% na fase tardia da doença pode ter uma sensibilidade menor nas fases mais precoces. Isto pode ocorrer porque a quantidade de anticorpos tende a ser pequena nos estágios iniciais da doença, resultando em testes negativos, como temos observado na infecção pela COVID-19.

Em termos práticos, é mais útil o resultado negativo de um teste sensível e o resultado positivo de um teste específico. Portanto, no contexto epidemiológico e clínico, a validade de um marcador sorológico diz respeito à capacidade com que ele pode prever a ocorrência da infecção. Nessas circunstâncias, devemos estar

preparados para responder à seguinte questão: dado que o teste apresentou resultado positivo (ou negativo), qual a probabilidade do indivíduo ser realmente portador da infecção (ou sadio)? Esse atributo do teste é conhecido como Valor Preditivo (VP) podendo ser positivo (VPP) ou negativo (VPN), e é determinado pela interação de três variáveis: a sensibilidade e a especificidade e a prevalência da doença na região estudada (94, 95).

- **Valor Preditivo Positivo (VPP):** é a probabilidade da presença da infecção quando o teste é positivo. Quando o teste tem alto VPP, um paciente que mostre resultado positivo muito provavelmente tem a doença que está sendo investigada.
- **Valor Preditivo Negativo (VPN):** é a probabilidade da ausência da infecção quando o teste é negativo. Quando um teste tem alto VPN, um paciente que mostre resultado negativo muito provavelmente não tem a doença que está

Resultado	RT-PCR		Total
	(+)	(-)	
TS (+)	a = 39	b = 20	a+b = 59
TS (-)	c = 8	d = 81	c+d = 89
Total	a+c = 47	b+d = 101	a+b+c+d = 148

Tabela 1. Desempenho do Teste Sorológico (TS) frente a RT-PCR, onde a = verdadeiros positivos, b = falsos positivos, c = falsos negativos e d = verdadeiros negativos.

$$\text{Valor Preditivo Positivo (VPP)} = a/(a+b) = 39/59 = 0,6610 \times 100 = 66,10\%$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo (VPN)} = d/(c+d) = 81/89 = 0,9101 \times 100 = 91,01\%$$

Voltando ao exemplo da Tabela 1, o VPP é a relação entre os verdadeiros positivos/soma dos verdadeiros positivos com os falsos positivos, ou seja, $a/(a+b)$. Sendo $a = 39$ e $(a+b) = 59$, o $VPP = 39/59 \rightarrow VPP = 0,6610 \times 100 = 66,10\%$. Enquanto o VPN é a relação entre os verdadeiros negativos/soma dos verdadeiros negativos com os falsos negativos, ou seja, $d/(d+c)$. Sendo $d = 81$ e $(d+c) = 89$, o $VPN = 81/89 \rightarrow 0,9101 \times 100 = 91,01\%$. Portanto, no exemplo citado podemos dizer que de cada 100 testes positivos, 66 seriam verdadeiramente positivos, e de cada 100 testes negativos, 91 seriam verdadeiramente negativos.

Enquanto a sensibilidade e a especificidade de um teste são propriedades inerentes ao teste e

não variam, os valores preditivos dependem da prevalência da doença na população estudada (Figura 14). O VPP aumenta com a prevalência, enquanto o VPN diminui. Assim, quando a prevalência é baixa o VPP é baixo, ocasionando vários resultados falsos positivos. Por outro lado, se a prevalência é baixa o VPN é alto, ocasionando poucos resultados falsos negativos. Portanto, o VPP e o VPN contêm informações sobre o poder do teste (sensibilidade e especificidade) e da prevalência da doença na população estudada, sendo assim uma medida de maior utilidade clínica.

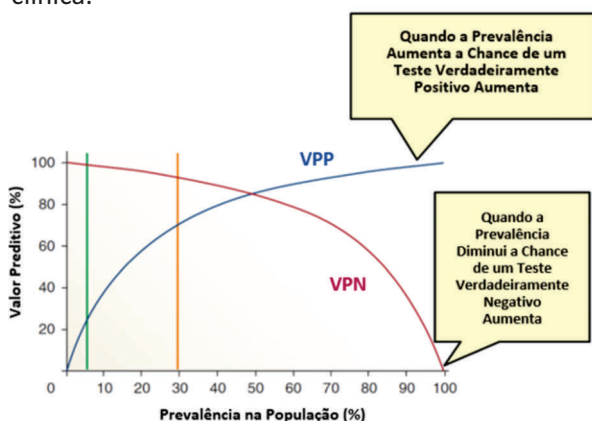


Figura 14. Valor Preditivo (Positivo ou Negativo) em função da prevalência da doença na população estudada.

Portanto, no caso da COVID-19, acredita-se que a prevalência possa variar de inferior a 5% a 20%, dependendo da região do país. Isso pode resultar em resultados mais falsos positivos e menos falsos negativos. Esta é a razão de estabelecermos estratégias na utilização dos testes sorológicos que visem a obtenção de melhores informações na sua aplicação.

Estratégias a serem utilizadas na aplicação dos testes sorológicos

Na pandemia atual, é preferível maximizar a especificidade e, portanto, o valor preditivo positivo em um algoritmo sorológico, na maioria dos casos, uma vez que a prevalência geral de anticorpos na maioria das populações é provavelmente baixa. Por exemplo, em uma população em que a prevalência é de 5%, um teste

com sensibilidade de 90% e especificidade de 95% produzirá um valor preditivo positivo de 49% (Tabela 2), ou seja, de cada 100 testes positivos, 49 seriam verdadeiramente positivos, e de cada 100 testes negativos, 99 seriam verdadeiramente negativos.

Resultado	Presença de Anticorpos (Prevalência = 5%)		Total
	(+)	(-)	
TS (+)	a = 226	b = 235	a+b = 461
TS (-)	c = 24	d = 4.515	c+d = 4.539
Total	a+c = 250	b+d = 4.750	a+b+c+d = 5.000

Tabela 2. Desempenho do Teste Sorológico (TS) frente a uma prevalência de 5% de anticorpos em uma população de 5.000 pessoas, onde: a = verdadeiros positivos, b = falsos positivos, c = falsos negativos e d = verdadeiros negativos.

Sensibilidade = $a/(a+c) \rightarrow 226/(226+24) = 226/250 = 0,90 \times 100 = 90\%$

Especificidade = $d/(b+d) \rightarrow 4.515/(235+4.515) = 4.515/4.750 = 0,95 \times 100 = 95\%$

VPP = $a/(a+b) \rightarrow 226/(226+235) = 226/461 = 0,49 \times 100 = 49\%$

VPN = $d/(c+d) \rightarrow 4.515/(24+4.515) = 4.515/4.539 = 99,4\%$

Prevalência = $(a+c)/(a+b+c+d) \rightarrow 250/5.000 = 0,05 \times 100 = 5\%$

Entretanto, se aumentarmos a especificidade do teste para 100% ou o mais próximo de 100% e mantivermos a sensibilidade de 90% e aplicarmos esse teste na mesma população de 5.000 pessoas, com a mesma prevalência de 5% de portadores de anticorpos, o valor preditivo positivo será de 100% (Tabela 3).

Resultado	Presença de Anticorpos (Prevalência = 5%)		Total
	(+)	(-)	
TS (+)	a = 226	b = 0	a+b = 226
TS (-)	c = 24	d = 4.750	c+d = 4.774
Total	a+c = 250	b+d = 4.750	a+b+c+d = 5.000

Tabela 3. Desempenho do Teste Sorológico (TS) frente a uma prevalência de 5% de anticorpos em uma população de 5.000 pessoas, onde: a = verdadeiros positivos, b = falsos positivos, c = falsos negativos e d = verdadeiros negativos.

Sensibilidade = $a/(a+c) \rightarrow 226/(226+24) = 226/250 = 0,90 \times 100 = 90\%$

Especificidade = $d/(b+d) \rightarrow 4.750/(0+4.750) = 4.750/4.750 = 1 \times 100 = 100\%$

VPP = $a/(a+b) \rightarrow 226/(226+0) = 226/226 = 1 \times 100 = 100\%$

VPN = $d/(c+d) \rightarrow 4.750/(24+4.750) = 4.750/4.774 = 99,4\%$

Prevalência = $(a+c)/(a+b+c+d) \rightarrow 250/5.000 = 0,05 \times 100 = 5\%$

Isso significa que, teoricamente, de cada 100 testes positivos, os 100 seriam verdadeira-

mente positivos, e de cada 100 testes negativos, 99 seriam verdadeiramente negativos.

Do exposto, fica claro que quando o objetivo é o rastreamento para identificar portadores de anticorpos anti-SARS-CoV-2, o melhor teste é o que tem alta especificidade, uma vez que impactará no valor preditivo positivo do teste. Essa é a razão do CDC recomendar a utilização de testes de alta especificidade na busca dos portadores de anticorpos (86).

Outro dado que podemos considerar é a *Razão de Verossimilhança* (RV). Ela combina *sensibilidade e especificidade* para quantificar se um teste é útil para medir a probabilidade de ter doença em comparação com a prevalência da doença na população estudada (94, 95,96). Ela pode ser positiva ou negativa.

RV positiva: $\frac{\text{probabilidade de resultado (+) nos portadores de anticorpos}}{\text{probabilidade de resultado (+) nos sem anticorpos}}$

Ela pode ser medida pela seguinte fórmula →

$$RV (+) = \frac{\text{Sensibilidade}}{(1 - \text{Especificidade})}$$

A RV (+) é a probabilidade de um indivíduo não portador de anticorpos apresentar um resultado positivo, ou seja, falso positivo. Quanto maior a RV (+) melhor o teste. Ela varia de 1 a infinito.

RV negativa: $\frac{\text{probabilidade de resultado (-) nos portadores de anticorpos}}{\text{probabilidade de resultado (-) nos sem anticorpos}}$

Ela pode ser medida pela seguinte fórmula →

$$RV (-) = \frac{(1 - \text{Sensibilidade})}{\text{Especificidade}}$$

A RV (-) é a probabilidade de um indivíduo portador de anticorpos apresentar um resultado negativo, ou seja, falso negativo. Quanto mais próximo de zero melhor é a performance do teste. Se inferior a 0,1 (ótima), 0,1-0,2 (moderada), 0,2-0,5 (baixa), 0,5-1,0 (mínima ou nenhuma).

Exemplo 1: se usarmos os dados da Tabela 2, onde a sensibilidade é de 90% e a especificidade de 95%, teríamos os seguintes valores de RV:

$$RV (+) = 0,90 / (1 - 0,95) \rightarrow 0,90 / 0,05 = 18$$

$$RV (-) = (1 - 0,90) / 0,95 \rightarrow 0,10 / 0,95 = 0,10$$

Interpretação: a RV (+) indica que a probabilidade do teste ser positivo nos portadores de anticorpos é 18 vezes maior do que nos não portadores. Enquanto a RV (-) indica que a probabilidade do teste ser negativo nos não portadores de anticorpos é de 0,10, o que pode ser considerado um teste de acurácia moderada.

Exemplo 2: se usarmos os dados da Tabela 3, onde a sensibilidade é de 90% e a especificidade de 100%, teríamos os seguintes valores de RV:

$$RV (+) = 0,90 / (1 - 1) \rightarrow 0,90 / 0 = \text{infinidade positiva}$$

$$RV (-) = (1 - 0,90) / 1 \rightarrow 0,10 / 1 = 0,10$$

Interpretação: a RV (+) indica que a probabilidade do teste ser positivo nos portadores de anticorpos é praticamente total. Enquanto a RV (-) indica que a probabilidade do teste ser negativo nos não portadores de anticorpos é de 0,10, o que pode ser considerado um teste de acurácia moderada.

Outro conceito é o de Acurácia do teste diagnóstico ou sua eficiência, quanto mais próximo de 1 melhor será o teste. Ela é representada pela soma dos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, dividido pelo total da amostragem.

No exemplo da Tabela 2, Acurácia = $(a + d) / (a + b + c + d) = 0,9482$ e no exemplo da Tabela 3, Acurácia = $(a + d) / (a + b + c + d) = 0,9952$. Podemos dizer que o teste da tabela 3 tem melhor eficiência que o da tabela 2.

A obtenção de todas essas variáveis é conseguida acessando o site <https://aps.bvs.br/apps/calculadoras/?page=1>, o qual calculará automaticamente após a entrada dos dados: verdadeiros positivos, falsos positivos, verdadeiros negativos e falsos negativos.

Devemos sempre ter em mente que a prática da medicina não pode ser somente na análise crítica da eficiência de uma terapia, mas também na análise adequada de um método diagnóstico. Para isso, ao analisar um teste diagnóstico devemos sempre estar atento (Quadro 3):

OBJETIVO DO TESTE	CUIDADO A SER TOMADO
Ter boa Sensibilidade	Alta sensibilidade pode levar a alguns resultados falsos positivos.
Ter boa Especificidade	Alta especificidade pode levar a alguns resultados falsos negativos.
Ter bom Valor Preditivo (Positivo ou Negativo)	O valor preditivo depende do local da aplicação do teste, ou seja, da prevalência da doença na população estudada.
Razão de Verossimilhança (Positiva e Negativa)	Deve ser conhecida e diferente de 1.

Quadro 3. Objetivos e cuidados na utilização de um teste diagnóstico

Estratégias a serem usadas para melhorar o Valor Preditivo Positivo (VPP) do teste

No caso da COVID-19, onde ainda há muitas dúvidas em relação ao comportamento do vírus, na resposta imunológica do hospedeiro e na cinética dos anticorpos IgM e IgG produzidos, o CDC recomenda a aplicação de três estratégias no sentido de melhorar o Valor Preditivo Positivo (VPP) dos testes sorológicos:

1ª. Escolher Um Teste Com Alta Especificidade: a escolha de um teste com especificidade superior a 99,5% determinará um alto VPP em populações onde a prevalência é igual ou superior a 5%.

2ª. Utilizar o teste em pessoas com alta probabilidade pré-teste: em locais onde há surtos da pandemia, onde se espera uma alta prevalência e, conseqüentemente, a probabilidade pré-teste seja elevada, a sorologia ajudará muito na separação dos contaminados e não contaminados.

3ª. Empregar algoritmo ortogonal: quando um indivíduo que testou positivo é testado novamente com um segundo teste diferente do primeiro, ou seja, com diferente formato ou diferentes antígenos. O objetivo é maximizar a especificidade, mantendo a máxima sensibilidade. O Quadro 4 mostra a aplicação de dois testes com similar sensibilidade e especificidade comparadas com um único teste, onde o VPP é modificado de acordo com a prevalência da doença.

PREVALÊNCIA	VPP para 1 teste Sensibilidade = 90% Especificidade = 95%	VPP para 2 testes ortogonal Sensibilidade = 90% Especificidade = 95%
2%	26.9%	86.9%
5%	48.6%	94.5%
10%	66.7%	97.3%
30%	88.5%	99.3%

Quadro 4. VPP quando utilizado um único teste sorológico e 2 testes ortogonal em diferentes prevalências.

Fonte: Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing – CDC, *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19). (Referência 86).

Portanto, vale reforçar que neste momento, onde os testes sorológicos estão em evolução, e a prevalência da COVID-19 ainda é baixa na população geral, usar teste de alta especificidade é imperativo, mesmo que a sensibilidade seja relativamente mais baixa, bem como, seguindo às diretrizes do CDC, o uso de testes ortogonal melhora muito o VPP.

Limitações dos testes sorológicos

A cinética da resposta dos anticorpos, a longevidade dos anticorpos, a capacidade dos anticorpos protegerem contra infecções repetidas, o título protetor do anticorpo neutralizante e a correlação dos títulos dos anticorpos de ligação à capacidade de neutralização ainda não foram determinados. Assim, apesar de os estudos com animais demonstrem proteção a curto prazo, a demonstração de proteção a longo prazo em humanos exigirá estudos futuros. Portanto, na pendência de dados adicionais, a presença de anticorpos não pode ser equiparada à imunidade de um indivíduo contra a infecção por SARS-CoV-2 (86,90).

Alguns testes podem exibir reatividade cruzada com outros coronavírus, como aqueles que causam o resfriado comum. Isso pode resultar em resultados de testes falsos positivos. Algumas pessoas podem não desenvolver anticorpos detectáveis após a infecção por SARS-CoV-2. Em outros, é possível que os níveis de anticorpos diminuam ao longo do tempo para níveis indetectáveis. Os anticorpos IgM e IgG não estão presentes no início da infecção. Assim, os resultados dos testes sorológicos não indicam, com certeza, a presença ou ausência de infecção no início da sintomatologia (98).

Recomendações para Uso de Testes Sorológicos

Embora as taxas de diagnóstico possam ser aumentadas quando se associam o RT-PCR e a sorologia (80, 83, 87, 100), a melhor aplicação da sorologia é após 14 dias do início da sintomatologia. Entretanto, ela pode ser realizada como um método para apoiar o diagnóstico de COVID-19 aguda em pessoas que se apresentam tardiamente. Pessoas com mais de 10 dias do início da sintomatologia, a sorologia pode ser usada junto com o método de detecção direta (RT-PCR). Isso maximizará a sensibilidade, pois esta estará diminuindo no teste de pesquisa de ácido nucléico e aumentando nos testes sorológicos.

A sorologia não é o teste indicado para o diagnóstico inicial, em larga escala, mas ela pode fornecer informações essenciais para rastrear onde a doença está e prever futuros pontos de concentração da doença. O vírus pode não ser mais detectável em algumas pessoas, mas confirmar se uma população foi exposta pode revelar quais áreas geográficas são vulneráveis e quais não são.

O que está claro é que a sorologia contribuirá para diversas áreas do diagnóstico, por exemplo, quanto tempo após a infecção os pacientes com COVID-19 desenvolvem anticorpos? Esta informação pode ajudar a acompanhar o progresso da doença. Quanto tempo duram os anticorpos da COVID-19 no organismo? A resposta será útil no desenvolvimento e programação de uma eventual vacina. Por fim, a sorologia fornecerá uma ferramenta crucial para rastrear e resolver a pandemia.

Finalmente, devemos sempre considerar a frase de *William Osler*:

“Medicina é a ciência da incerteza e a arte da probabilidade”

POR QUE OS TESTES SOROLÓGICOS SÃO NECESSÁRIOS NA COVID-19?

Há ainda muitas lacunas a serem preenchidas para o entendimento sobre o SARS-CoV-2 e a imunidade, afetando, com isso, a interpretação dos resultados dos testes sorológicos. Não está claro se os anticorpos detectados pelos testes neutralizam o vírus e o que eles significam para a proteção contra a reinfeção. Também não sabemos a quantidade de anticorpos necessária para a proteção, bem como se a imunidade mediada por células (imunidade celular) protege contra o SARS-CoV-2. Além disso, não sabemos o tempo de duração dos anticorpos nos pacientes recuperados e quanto tempo eles são eficazes, já que não temos conhecimento ainda se a infecção determina memória imune, fornecendo proteção de longo prazo. Por último, não sabemos sobre a reação cruzada dos testes sorológicos com outros coronavírus circulantes em pessoas com anticorpos preexistentes (101). Apesar de todas essas questões, a sorologia é uma das ferramentas importantes em saúde pública, como podemos relatar a seguir algumas de suas aplicações:

1. Ela fornece informações críticas sobre a incidência da infecção por SARS-CoV-2 na população, principalmente em levantamentos regionais. Compreender quem já foi infectado pode ajudar nos esforços de rastreamento de contatos, entendendo a amplitude da disseminação do SARS-CoV-2 nas comunidades.
2. Seu objetivo principal é o de determinar a soroprevalência, e isso deveria ser realizado por todos os departamentos de saúde. Neste item, os testes rápidos facilitam muito sua aplicação em escala populacional.
3. A vigilância sorológica, representada pela aplicação em intervalos regulares dos testes, permite avaliar a velocidade com que a população é exposta ao SARS-CoV-2.
4. A soroprevalência entre indivíduos considerados funcionários essenciais e que,

consequentemente, estão em maior risco, como profissionais da saúde e os que trabalham com populações vulneráveis, como por exemplo, em lares de idosos, pode fornecer informações valiosas se os portadores de testes positivos se correlacionam com a imunidade.

5. Estudos de soroprevalência longitudinal são importantes na compreensão do impacto que a COVID-19 terá sobre a população e nas medidas de relaxamento do distanciamento social.

6. Nos pacientes que apresentam resultados positivos, o teste sorológico de acompanhamento pode alertar sobre a diminuição da imunidade se os anticorpos caírem abaixo do limite de detecção do teste.

7. Apesar de alguns estudos sugerirem o tempo para a presença dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 no sangue, ainda não está claro a dinâmica longitudinal dos anticorpos, assim os testes sorológicos têm papel fundamental no estabelecimento desta variável.

Referências Bibliográficas

- Corman, V.M., Muth, D. et al. *Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses*, C. Adv. Virus Res. 100, 163–188, 2018.
- Lu, R., Zhao, X. et al. *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding*, The Lancet 395 February, 2020.
- Zhou, P., Yanget, X.L. al. *A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin*, Nature, 579: 270–273, 2020.
- CDC, <https://www.cdc.gov/sars/about/faq.html>
- WHO, <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en>
- Drosten, C. et al. *Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome*. N. Engl. J. Med. 348, 1967–1976 (2003).
- Aiping Wu et al., *Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China*, Cell Host & Microbe, 27: 325-328, March 11, 2020.
- Zhang, H., Penninger, J.M. et al.: *Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target*, Intensive Care Med, 46: 586–590, 2020.
- Mark Bartlam, Haitao Yang and Zihe Rao, *Structural insights into SARS coronavirus proteins*, Current Opinion in Structural Biology 2005, 15:664–672
- Gallagher TM, Buchmeier MJ: *Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis*. Virology 2001, 279:371-374.
- Yan, R., Zhang, Y. et al. *Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2*, Science 367, 1444–1448, 2020.
- Millet JK, Whittaker GR. *Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis*. Virus Res. 2015; 202:120-134.
- Chen, Y., Guo, Y. et al. Zhao, *Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV*, Biochemical and Biophysical Research Communications 525 (2020) 135-140.
- Narayanan, K., Chen, C.J. et al., *Nucleocapsid-Independent Specific Viral RNA Packaging via Viral Envelope Protein and Viral RNA Signal*, J. Virol., Mar. 2003, p. 2922–2927.
- Sun, Z. F., Meng, X.J., *Antigenic Cross-Reactivity between the Nucleocapsid Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus and Polyclonal Antisera of Antigenic Group I Animal Coronaviruses: Implication for SARS Diagnosis*, J. Clin. Microbiol, Vol. 42, No. 5: 2351–2352, 2004).
- Gu, J., Han, B., Wang, J., (2020) *COVID-19: gastrointestinal manifestations and potential fecal-oral transmission*. Gastroenterology (Article in Press). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.054>
- Holshue, M.L., DeBolt, C., Lindquist, S. et al (2020) *First case of 2019 novel coronavirus in the United States*. N Engl J Med 382:929–936. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>
- Wu, D., Wu, T., Liu, Q., Yang, Z. (2020) *The SARS-CoV-2 outbreak: what we know*. Int J Infect Dis (Article in Press). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.004>.
- Guan, W.J., Ni, Z.Y., Hu, Y., et al. *Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China*. N Engl J Med 2020; 382:1708-20.
- Lauer, S.A., Grantz, K.H., Bi, Q., et al. *The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application*. Ann Intern Med 2020.
- Karakike, E., Giamarellos-Bourboulis, E.J., (2019) *Macrophage activation-like syndrome: a distinct entity leading to early death in sepsis*. Front Immunol 10: 55
- Sharma, R., Agarwal, M. and Saxena, S.K., *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Medical Virology: from Pathogenesis to Disease Control, Chapter 6: Clinical Characteristics and Differential Clinical Diagnosis of Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* Springer Nature Singapore Pte Ltd.
- Nicastri, E., Petrosillo, N., Bartoli, T.A. et al., *National Institute for the Infectious Diseases “L. Spallanzani” IRCCS. Recommendations for COVID-19 Clinical Management*. Infectious Disease Reports 2020;12(1): Pubmed Journal

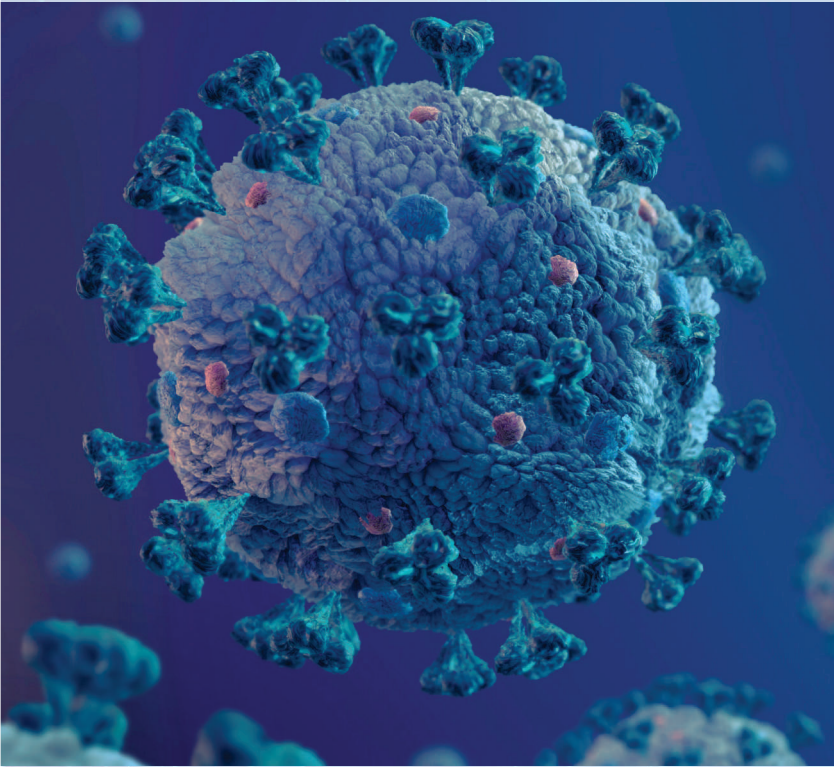
24. Health, A., *Clinical management guideline for hospitalised patients on the ward with COVID-19* (version 5). 2020;
25. Wu, Z., McGoogan, J.M., (2020) *Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Centre for Disease Control and Prevention*. JAMA, Volume 323, Number 13.
26. Zu, F., Yu, T., Du, R. et al (2020) *Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study*. Lancet, 395(10229): 1054-1062, 2020.
27. Chen, N., Zhou, M., Dong, X. et al. *Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study*. Lancet 2020;395:507-13.
28. Wang, D., Hu, B., Hu, C. et al. *Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China*. JAMA. 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585
29. Pan, L., Um, M., Yang, P. et al., *Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study*. Am J Gastroenterol, 115 (5): 766-773, 2020.
30. Cai, J., Xu, J., Lin, D., et al. *A Case Series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features*. Clin Infect Dis ctaa198, <https://doi.org/10.1093/cid/ctaa198>, 2020.
31. Wei, M., Yuan, J., Liu, Y., Fu, T., Yu, X., Zhang, Z.J., *Novel Coronavirus Infection in Hospitalized Infants Under 1 Year of Age in China*. JAMA 2020. 323(13):1313-1314. doi:10.1001/jama.2020.2131
32. Hu, Z., Song, C., Xu, C. et al., *Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China*. Sci China Life Sci, 63: 706-11, 2020.
33. Wei, W.E., Li, Z., Chiew, C.J. et al., *Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2 – Singapore, January 23–March 16, 2020*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 69: 411-5, 2020.
34. Rothe, C., Schunk, M., Sothmann, P. et al., *Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany*. N Engl J Med, 382:970-1, 2020.
35. Zou, L., Ruan, F., Huang, M. et al., *SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients*. N Engl J Med, 382: 1177-9, 2020.
36. Li, R., Pei, S., Chen, B. et al., *Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2)*. Science, 368:489-93, 2020.
37. Livingston, E., Bucher, K., *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Italy*. JAMA 2020, 323(14):1335. doi:10.1001/jama.2020.4344
38. Arentz, M., Yim, E., Klaff, L. et al., *Characteristics and Outcomes of 21 Critically Ill Patients With COVID-19 in Washington State*. JAMA 2020, 323(16):1612-1614. doi:10.1001/jama.2020.4326
39. Team, C.C.-R., *Severe Outcomes Among Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) – United States, February 12–March 16, 2020*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 69: 343-6, 2020.
40. Liu, Z., Bing X., Zhi, X.Z., *Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology T. [The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China]*, 41: 145-51, 2020.
41. Team, C.C.-R., *Preliminary Estimates of the Prevalence of Selected Underlying Health Conditions Among Patients with Coronavirus Disease 2019 – United States, February 12–March 28, 2020*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 69: 382-6, 2020.
42. Ding, Q., Lu, P., Fan, Y., Xia, Y., Liu, M., *The clinical characteristics of pneumonia patients coinfecting with 2019 novel coronavirus and influenza virus in Wuhan, China*. J Med Virol, 1–7, 2020.
43. Jansen, J.M., Gerlach, T., Elbahesh, H., Rimmelzwaan, G.F., Saletti, G., *Influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cell-mediated immunity induced by infection and vaccination*. J Clin Virol., 119: 44-52, 2019.
44. Long, Q.X., Liu, B.Z., Deng, H.J. et al., *Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19*. Nat Med., 26: 845–848, 2020.
45. Zheng, M., Gao, Y., Wang, G. et al.: *Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients*. Cell Mol Immunol. 2020.
46. Schmidt, M.E., Varga, S.M., *The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections*. Front Immunol., 9:678, 2018.
47. Tan, L., Wang, Q., Zhang, D. et al., *Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study*. Signal Transduct Target Ther., 5: 33, 2020.
48. Flores-Torres, A.S., Salinas-Carmona, M.C., Salinas, E., Rosas-Taraco, A.G., *Eosinophils and Respiratory Accepted Article Viruses*. Viral Immunol., 32 (5): 198-207, 2019.
49. Azkur, A.K., Akdis, M., Azkur, D., Sokolowska, M. et al., *Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19*. Europ J Allergy and Cl Immunol. 5, 2020 doi: 10.1111/ALL.14364
50. Perlman, S., Dandekar, A.A., *Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS*. Nat Rev Immunol 2005; 5: 917–27.
51. Netea, M.G., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Domínguez-Andrés, J. et al. *Trained immunity: a tool for reducing susceptibility and severity of SARS-CoV2 infection*. Cell, Journal pre-proof, 2020, DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.042.
52. Merad, M., Martin, J.C. *Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages*. Nat Rev Immunol 20, 355–362 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>.
53. Wu, C. et al., *Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China*. JAMA Intern. Med. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994> (2020).
54. Zhou, F. et al. *Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a*

- retrospective cohort study.* Lancet, 395, 1054–1062, 2020.
55. Qin, C. et al. *Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China.* Clin. Infect. Dis. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>, 2020.
 56. Yang, Y. et al. *Exuberant elevation of IP-10, MCP-3 and IL-1ra during SARS-CoV-2 infection is associated with disease severity and fatal outcome.* Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20029975>, 2020.
 57. Diamanti, A.P. et al. *Cytokine Release Syndrome in COVID-19 Patients, A New Scenario for an Old Concern: The Fragile Balance between Infections and Autoimmunity.* Int. J. Mol. Sci., 21, 3330, 2020.
 58. Shimabukuro-Vornhagen, A., Gödel, P., Subklewe, M., Stemmler, H.J. et al., *Cytokine release syndrome.* J. Immunother. Cancer., 6: 56, 2018. doi: 10.1186/s40425-018-0343-9.
 59. Mehta, P. et al. *COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression.* Lancet 395, 1033–1034, 2020.
 60. Cohen, L.A., Gutierrez, L., Weiss, A. et al., *Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway.* Blood, 116, 1574–1584, 2010.
 61. Chen, G., Wu, D., Guo, W. et al., *Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019.* J. Clin. Investig., 130 (5): 2620–2629, 2020, doi: 10.1172/JCI137244.
 62. Huang, C., Wang, Y., Li, X. et al., *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.* Lancet., 395: 497–506, 2020.
 63. Tang, N., Li, D., Wang, X., Sun, Z., *Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia.* J Thromb Haemost., 18: 844–847, 2020.
 64. Cui, S., Chen, S., Li, X., Liu, S. and Wang, F., *Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia.* J Thromb Haemost., 18: 1421–1424, 2020.
 65. Taylor, F.B. Jr, Roth, C.H., Hoots, W.K., et al. *Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation.* Thromb Haemost.; 86(5): 1327–1330, 2001.
 66. Levi, M., Nieuwdorp, M., Van der Poll, T. and Strokes, E., *Metabolic modulation of inflammation-induced activation of coagulation.* Semin. Thromb. Hemost. 34: 26–32, 2008.
 67. Lippi, G., Bonfanti, L., Saccenti, C., Cervellin, G., *Causes of elevated D-dimer in patients admitted to a large urban emergency department.* Eur J Intern Med., 25 (1): 45–48, 2014.
 68. Terpos, E. et al., *Hematological findings and complications of COVID-19,* Am J Hematol.; 95: 834–847, 2020.
 69. Lippi G, Favaloro EJ. *D-dimer is associated with severity of coronavirus disease 2019: a pooled analysis.* Thromb Haemost. 2020;120(05): 876–878
 70. Connors, J.M., Levy, J.H., *COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation.* Blood, 135 (23): 2033–2040, 2020.
 71. Ronco, C., Reis, T., Husain-Syed, F., *Management of acute kidney injury in patients with COVID-19.* Lancet Respir Med, 5, 2020 [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30229-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30229-0)
 72. Lippi, G. and Plebani, M., *Laboratory medicine resilience during coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic.* De Gruyter, Adv Lab Med, 2020, <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0035>
 73. Henry, B.M., Santos de Oliveira, M.H., Benoit, S., Plebani, M., Lippi, G., *Hematologic, biochemical, and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis.* Clin Chem Lab Med, 2020. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0369>.
 74. Pan American Health Organization, 6 May, 2020, *Interpretation of laboratory results for COVID-19 diagnosis.*
 75. Sethuraman, N. et al., *Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2.* JAMA, Published online May 6, 2020.
 76. Grzelak, L. et al., *SARS-CoV-2 serological analysis of COVID-19 hospitalized patients, pauci-symptomatic individuals and blood donors.* medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.21.20068858>.this version April 24, 2020.
 77. Xie, X., Zhong, Z., Zhao, W., Zheng, C., Wang, F., Liu, J., *Chest CT for typical 2019-nCoV pneumonia: relationship to negative RT-PCR testing.* Radiology, 2020:200343. doi: 10.1148/radiol.2020200343.
 78. Ai, T., Yang, Z., Hou, H., Zhan, C., Chen, C., Lv, W., et al., *Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID19) in China: a report of 1014 cases.* Radiology 2020 : 200642 . doi : 10.1148/radiol.2020200642.
 79. Yang, Y. et al. *Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections.* medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.11.20021493>.this version February 17, 2020.
 80. Zhang, W. et al. *Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes.*, Emerg Microbes Infect, 9(1): 386–389, 2020.
 81. Wang, W. et al. *Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens,* JAMA, May 12, 2020 Volume 323, Number 18.
 82. Zou, L. et al., *SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients,* N Engl J Med, March 19, 2020.
 83. Zhao, J. et al., *Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients of Novel Coronavirus Disease 2019,* Clin Infect Dis., April, 2020.
 84. Lippi, G., Simundic, A.M. and Plebani, M., *Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19).* Clin Chem. Lab Med., 58 (7), 2020.
 85. Food and Drug Administration. *New York SARS-CoV-2 Real-time RT-PCR Diagnostic Panel – February 29, 2020.* <https://www.fda.gov/media/135662/download>. March 9, 2020.

86. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing—CDC, *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*.
87. To, K.K.-W., Tsang, O.T.-Y., Leung, W.-S., et al., *Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study*. *Lancet Infect Dis.*, 20 (5): 565-574, 2020. doi:10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
88. Chan, P.K., Liu, E.Y., Leung, D.T. et al., *Evaluation of a recombinant nucleocapsid protein-based assay for anti-SARS-CoV IgG detection*. *J Med Virol.*, 75 (2): 181–184, 2005.
89. Sun, B. et al. *Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients*. *Emerging, Microbes & Infections* 2020, VOL.9, <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1762515>.
90. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., *Immunological memory*. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York: Garland Science; 2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27158/>. Accessed April 17, 2020.
91. Long, Q., Tang, X., Shi, Q. et al., *Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections*. *Nat Med*, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>
92. Johns Hopkins Center for Health, *Serology-based tests for COVID-19*. <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/serology/Serology-based-tests-for-COVID>
93. Bastos, R.R. e Bastos, R.R, *Sensibilidade e Especificidade*. Univ Fed J Fora, Departamento de Estatística.
94. Roque, A., *Probabilidade e Estatística I – Probabilidades em Biomedicina: Uma Aplicação da Regra de Bayes*. <http://sisne.org/Disciplinas/Grad/ProbEstat1/aula%2016.pdf>
95. Câmara, F.P., *Psiquiatria E Estatística VI: Fundamentos Dos Testes Diagnósticos*. *Psych. On line Brasil*, 14 (5), 2009.
96. *Validação de Testes Diagnósticos*. <https://www.misodor.com/VALIDTESTDIA.html>
97. Mariska, M.G., *Variation of a test's sensitivity and specificity with disease prevalence*, *CMAJ*, August 6, 185(11): E537-E544, 2013.
98. American Medical Association. *Serological testing for SARS-CoV-2 antibodies*. <https://www.ama-assn.org/delivering-care/public-health/>
99. IDSA - *COVID-19 Antibody Testing Infectious*, <https://www.idsociety.org/globalassets/idsa/public-health/covid-19>
100. Guo, L., Ren, L. et al. *Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19)*, *Clinical Infectious Diseases*, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>
101. Gronvall, G., Connell, N., Kobokovich, A. et al., *Developing a National Strategy for Serology (Antibody Testing) in the United States*, Johns Hopkins University, Published on April 22, 2020.
102. Zhang, Y., Geng, Tan, Y., *New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system*, *Biom and Pharm*, 127, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110195>
103. Hirano, T., Murakami, M., *COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome*. *Immunity*. 2020. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761320301618>
104. Naoko, I., Tadashi, O., Yukiko, S. et al., *TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection*. *Journal of Virology*, 93 (6): 1815-18, 2019, <https://jvi.asm.org/content/jvi/93/6/e01815-18.full.pdf>.
105. Bohn, M.K., Lippi, G., Horvath, A. et al., *Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence*, *Clin Chem Lab Med*, 2020. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0722>
106. Scohy, A., Anantharajah, A. et al., *Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis*, *Journal of Clinical Virology* 129, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104455>

Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM WAMA Diagnóstica





Estudo comparativo do teste Imuno-Rápido COVID-19 da WAMA Diagnóstica com um Ensaio de Quimioluminescência (CLIA) com Soros Positivos e Negativos para COVID-19

A sensibilidade e a especificidade clínicas do kit Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA foram determinadas em um estudo comparativo com um kit de Quimioluminescência do mercado com 709 amostras obtidas de um hospital de referência, das quais 183 eram positivas e 526 negativas. Todas as amostras positivas analisadas tinham o teste de RT-PCR positivo. Os resultados são mostrados no quadro abaixo.

Estudo Comparativo do Imuno-Rápido COVID-19 com um Teste de Quimioluminescência			
COVID-19 IgG/IgM	CLIA Positivo	CLIA Negativo	TOTAL
IgG/IgM Positivo	171	12	183
IgG/IgM Negativo	12	514	526
TOTAL	183	526	709
SENSIBILIDADE	93,44%		
ESPECIFICIDADE	97,70%		

COMENTÁRIOS DE NOSSA EMPRESA SOBRE ESTA AVALIAÇÃO

O teste mostrou muito boa correlação com o teste de quimioluminescência, sendo opção segura para atender os objetivos dos itens informados na seção desse artigo “**Por Que Os Testes Sorológicos São Importantes Na COVID-19?**”, além de ser teste simples para realização no ponto de atendimento. O Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM tem as características de performance necessária para ser auxiliar importante no combate da atual pandemia.

Relatório de Estudo de Sensibilidade e Especificidade do Teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica para Aplicação Populacional

Foram estudados um total de 1.156 amostras de soro, plasma e sangue total, sendo 279 amostras positivas, confirmadas com RT-PCR e 877 amostras negativas, também confirmadas com RT-PCR, as quais foram obtidas antes de novembro de 2019, com o objetivo de avaliar o teste Imuno-Rápido COVID-19 da WAMA Diagnóstica e observar sua sensibilidade e especificidade na evolução sintomática da doença, ou seja, em tempos diferentes do início da sintomatologia. Os dias da avaliação foram: até 7 dias do início da sintomatologia (1ª semana), de 8 a 14 dias (após a 1ª semana) e mais do que 14 dias (após a 2ª semana).

Das 279 amostras positivas, o Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA identificou 249 amostras de IgM positivas, 255 amostras de IgG positivas e 265 amostras de IgG e/ou IgM positivas. Os resultados são mostrados nos quadros abaixo:

Quadro 1. *Sensibilidade do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM baseado em dias do início da sintomatologia.*

Quadro 2. *Sensibilidade, Especificidade, VPP, VPN e Concordância com RT-PCR do Anticorpo IgM do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM.*

Quadro 3. *Sensibilidade, Especificidade, VPP, VPN e Concordância com RT-PCR do Anticorpo IgG do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM.*

Quadro 4. *Sensibilidade, Especificidade, VPP, VPN e Concordância com RT-PCR dos Anticorpos Combinados IgG e IgM do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM.*

Quadro 1. Sensibilidade do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM baseado em dias do início da sintomatologia.

Estudo da Sensibilidade do Teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica				
	RT-PCR POSITIVO			TOTAL
	Dias do Início dos Sintomas			
	Até 7	8 a 14	> 14	
Nº Amostras	31	85	163	279
IgM	19	79	151	249
IgG	16	78	161	255
IgM + IgG	19	83	163	265
SENSIBILIDADE IgM	19/31 (61,29%)	79/85 (92,94%)	151/163 (92,63%)	249/279 (89,24%)
SENSIBILIDADE IgG	16/31 (51,61%)	78/85 (91,76%)	161/163 (98,77%)	255/279 (91,39%)
SENSIBILIDADE IGM + IgG	19/31 (61,29%)	83/85 (97,64%)	163/163 (100%)	265/279 (94,98%)

Quadro 2. Sensibilidade, Especificidade, VPP, VPN e Concordância com RT-PCR do Anticorpo IgM do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM.

Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do Anticorpo IgM do Teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica			
Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM	RT-PCR		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
IgM Positiva	249	14	263
IgM Negativa	30	863	893
Total	279	877	1.156
SENSIBILIDADE IgM	249/(249+30) = 88,77%		
ESPECIFICIDADE IgM	863/(863+14) = 98,40%		
*VPP IgM	249/(249+14) = 94,67%		
**VPN IgM	863/(863+30) = 96,64%		
CONCORDÂNCIA	(249+863)/1156 = 96,19%		

*VPP IgM: Valor Preditivo Positivo da IgM
**VPN IgM: Valor Preditivo Negativo da IgM

Quadro 3. Sensibilidade, Especificidade, VPP, VPN e Concordância com RT-PCR do Anticorpo IgG do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM.

Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do Anticorpo IgG do Teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica			
Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM	RT-PCR		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
IgG Positiva	255	2	257
IgG Negativa	24	875	899
Total	279	877	1.156
SENSIBILIDADE IgG	255/(255+24) = 91,39%		
ESPECIFICIDADE IgG	875/(875+2) = 99,77%		
*VPP IgG	255/(255+2) = 99,22%		
**VPN IgG	875/(875+24) = 97,33%		
CONCORDÂNCIA	(255+875)/1156 = 97,75%		

*VPP IgM: Valor Preditivo Positivo da IgM
**VPN IgM: Valor Preditivo Negativo da IgM

Quadro 4. Sensibilidade, Especificidade, VPP, VPN e Concordância com RT-PCR dos Anticorpos Combinados IgG e IgM do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM.

Avaliação da Sensibilidade e Especificidade dos Anticorpos IgG/IgM Combinados do Teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica			
Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM	RT-PCR		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
IgG + IgM Positiva	265	14	279
IgG + IgM Negativa	14	863	877
Total	279	877	1.156
SENSIBILIDADE IgG + IgM	265/(265+14) = 94,98%		
ESPECIFICIDADE IgG + IgM	875/(875+2) = 98,40%		
*VPP IgG + IgM	265/(265+14) = 94,98%		
**VPN IgG + IgM	863/(863+14) = 98,40%		
CONCORDÂNCIA	(265+863)/1156 = 97,57%		

*VPP IgM: Valor Preditivo Positivo da IgM
**VPN IgM: Valor Preditivo Negativo da IgM

COMENTÁRIOS DE NOSSA EMPRESA SOBRE ESTA AVALIAÇÃO

A performance do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica mostrou nesta avaliação extensiva o que se esperava como resposta para sua aplicação. A sensibilidade diagnóstica da IgM foi de 88,77% e da IgG de 91,39%, quando avaliadas separadamente. Entretanto, a sensibilidade da IgM e IgG combinada atingiu 94,98%. A especificidade diagnóstica foi de 98,40% para IgM, 99,77% para a IgG e de 98,40% na combinada (IgG+IgM). O Valor Preditivo Positivo (VPP) para IgM e IgG foi de 94,67% e 99,22%, respectivamente, atingindo no combinado (IgG+IgM) 94,98%; enquanto o Valor Preditivo Negativo foi 96,64%, 97,33% e 98,40%, respectivamente para IgM, IgG e combinado (IgG+IgM).

A aplicação do teste após a segunda semana (após 14 dias), mostra altos índices de sensibilidade, atingindo 98,77% para IgG e 100% quando usado o critério combinado (IgG+IgM). Isso qualifica o teste como ideal para o diagnóstico de infecção tardia, ou seja, com mais de 14 dias do início dos sintomas. Entretanto, seu uso nos primeiros 14 dias após o início dos sintomas mostrou uma queda de sensibilidade que ocasionará resultados falsos negativos.

Outra observação importante é que a especificidade da IgG de 99,77% qualifica o Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM como teste a ser aplicado nos objetivos propostos na seção **“Por Que os Testes Sorológicos São importantes Na COVID-19?”**, uma vez que tal performance preenche o critério estabelecido pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) dos Estados Unidos, onde testes de alta especificidade determinam altos Valores Preditivos Positivos (VPP), o que podemos verificar no Quadro 3, um VPP para IgG de 99,22%.

Por último, gostaríamos de realçar a Acurácia do teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica, ou seja, seu índice de concordância com o teste de RT-PCR, o qual foi de 96,19%, 97,75% e 97,57%, respectivamente, para IgM, IgG e combinado (IgG+IgM).

Avaliação do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica pelo Programa de Avaliação de Kits para Coronavírus através do Projeto Conjunto entre a SBPC/ML, SBAC, ABRAMED e CBDL

Avaliação em amostras de soro, cujas amostras positivas foram determinadas pelo teste de amplificação de ácido nucléico, RT-PCR, sendo o painel de soros obtidos em diferentes dias do início da sintomatologia, conforme mostrado abaixo:

- De 7 a 14 dias do início dos sintomas: 22 amostras.
- De 15 a 21 dias do início dos sintomas: 28 amostras.
- Mais de 21 dias do início dos sintomas: 36 amostras.
- Geral (todos os dias): 66 amostras.

Os resultados são mostrados no quadro abaixo:

Avaliação da Sensibilidade, Especificidade, VPP, VPn, RV (+), RV (-) e Acurácia do Teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica Baseado no Tempo da Sintomatologia					
	Anticorpos	Dias do Início dos Sintomas			Geral
		7 a 14	15 a 21	> 21	
SENSIBILIDADE	IgG	58.3%	72.2%	100%	82.1%
	IgM	50.0%	55.6%	61.54%	57.1%
ESPECIFICIDADE	IgG	100%	100%	100%	100%
	IgM	100%	100%	100%	100%
VALOR PREDITIVO (+)	IgG	100%	100%	100%	100%
	IgM	100%	100%	100%	100%
VALOR PREDITIVO (-)	IgG	66.7%	66.7%	100%	50%
	IgM	62.5%	55.6%	50%	29.4%
RAZÃO VEROSSIMILHANÇA (+)	IgG	> 99	> 99	> 99	> 99
	IgM	> 99	> 99	> 99	> 99
RAZÃO VEROSSIMILHANÇA (-)	IgG	0.42	0.28	0.00	0.18
	IgM	0.50	0.44	0.38	0.43
ACURÁCIA	IgG	77.3	82.1	100	84.8
	IgM	72.7	71.4	72.2	63.6

CONCLUSÃO DO GRUPO CONJUNTO: o teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica tem seu melhor desempenho após 21 dias da sintomatologia.

COMENTÁRIOS DE NOSSA EMPRESA SOBRE ESTA AVALIAÇÃO

A avaliação do grupo representado pela SBPC/ML, SBAC, ABRAMED e CBDL mostrou que o Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica não é teste ideal para aplicar no diagnóstico da infecção aguda, ou seja, nas 2 primeiras semanas da sintomatologia, e isso é uma característica dos testes sorológicos no atual momento, onde eles não substituem a biologia molecular (RT-PCR) nas 2 semanas iniciais dos sintomas. O que vem sendo mostrado em alguns trabalhos da literatura é que o uso do RT-PCR junto com a sorologia pode aumentar a detecção de portadores virais ativos.

Outra observação importante da avaliação é que o teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM mostrou alta especificidade (100%) em todo o período da sintomatologia, determinando um elevado Valor Preditivo Positivo (100%), o que significa que a ocorrência de um teste positivo é altamente sugestivo do indivíduo ter anticorpo anti-SARS-CoV-2, o que está em concordância com a determinação do CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) dos Estados Unidos, ou

seja, devido a baixa prevalência da doença na população deve-se priorizar o uso de testes de alta especificidade, acima de 99%.

A alta sensibilidade da IgG (100%), a elevada especificidade da IgG (100%), o elevado Valor Preditivo Positivo da IgM e IgG (100%) e alto Valor Preditivo Negativo da IgG (100%), a elevada Razão de Verossimilhança Positiva da IgG (> 99), a Razão de Verossimilhança Negativa da IgG igual a zero e a Acurácia elevada da IgG (100%) nos indivíduos com mais de 21 dias do início dos sintomas, permite dizer que o Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica se coloca entre os testes de boa performance para atender todos os itens propostos na seção desse artigo “**Por Que Os Testes Sorológicos São Importantes Na COVID-19?**”, sendo bastante útil no conhecimento da soroprevalência, no rastreamento de contatos, na velocidade da disseminação da doença, na vigilância sorológica etc.

Finalmente, sabemos que há considerável heterogeneidade na resposta imune em função da genética do hospedeiro ou de outros fatores, de modo que alguns indivíduos têm uma forte resposta humoral à infecção por SARS-CoV2, enquanto outros não. Todos esses fatores, sobre os quais atualmente não podemos controlar, podem afetar o desempenho do ensaio. Além do que, o desempenho provavelmente varia um pouco de laboratório para laboratório, ou seja, entre os vários estudos, devido às diferenças na composição do painel de soro usado, portanto, a avaliação da performance do teste deve ser sempre realizada observando-se o desempenho geral nos vários estudos, onde foram usados diferentes painéis de soro. Além do que, amostragem baixa pode afetar os índices de performance do teste.

Avaliação do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica pelo INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) da FIOCRUZ

O INCQS avaliou o Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica no dia 11/07/2020. A análise tem como objetivo confirmar se as informações contidas na bula do produto são verdadeiras no que se refere a sensibilidade e especificidade dos testes oferecidos no mercado brasileiro. A avaliação não considera o tempo do início da sintomatologia, mas a performance geral do teste, ou seja, como o teste responde a um painel de soros positivos e negativos.

O relatório final tem as seguintes conclusões:

SENSIBILIDADE: o resultado mostrou sensibilidade igual a **83,3%**. [DECLARADO PELO FABRICANTE NA INSTRUÇÃO DE USO: **83,3%**].

ESPECIFICIDADE: o resultado mostrou especificidade igual a **98,4%**. [DECLARADO PELO FABRICANTE NA INSTRUÇÃO DE USO: **93,1%**].

CONCLUSÃO DO ENSAIO: SATISFATÓRIO.

COMENTÁRIOS DE NOSSA EMPRESA SOBRE ESTA AVALIAÇÃO

Há muitos testes no mercado brasileiro que informa sobre elevados índices de sensibilidade e especificidade sem considerar o tempo do início dos sintomas, como se esses índices representasse a performance do teste desde o início da sintomatologia. Isso não é verdadeiro. O INCQS está avaliando se as informações que o fabricante do kit relata na bula estão em concordância com a performance geral do teste. O Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM mostrou resultado em conformidade com sua bula. Entretanto, devemos sempre enfatizar que os testes sorológicos não são os testes de escolha nas

duas primeiras semanas do início da sintomatologia, embora possam ser aplicados junto com o RT-PCR com o objetivo de ampliar a capacidade de identificar infecção ativa, e esta característica da sorologia esta relacionada a bem conhecida janela imunológica, a qual não ocorre somente na COVID-19, mas em todos os processos infecciosos, independentemente de sua etiologia.

Finalmente, reforçamos que a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo de um teste sorológico devem ser sempre analisados através dos vários estudos realizados com o teste, uma vez que o painel de amostras utilizado pode determinar algumas variações na performance do teste, assim como o tamanho da amostragem também é fator importante nessas conclusões, ou seja, painel e quantidade de amostras podem determinar algumas variações nos índices de performance do teste.

Validação do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica

INSTITUTO RENÉ RACHOU, FIOCRUZ MINAS

Objetivos

1. Estimar sensibilidade, especificidade e acurácia dos marcadores IgM e IgG (Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM - WAMA), em soro, frente a um painel de casos e controles;
2. Estimar o desempenho do teste em soros de pacientes confirmados para SARS-CoV-2 e com diferentes tempos desde o início dos sintomas e com e sem critérios para síndrome respiratória aguda grave (SRAG);
3. Avaliar a concordância entre resultados do teste entre diferentes observadores.

Foram testadas 289 amostras de soro, 173 delas de pacientes com confirmação de infecção por Sars-Cov-2 por RT-PCR em swab de nasofaringe. O grupo controle foi constituído por 116 amostras de pacientes com marcadores sorológicos para outras doenças infecciosas e indivíduos sem suspeita de doenças infecciosas, todos colhidos antes de janeiro de 2020, marco da introdução do novo coronavírus no Brasil. Os casos incluídos neste painel foram avaliados entre 21 de abril a 10 de junho de 2020, em Minas Gerais, todos adultos com idade variando de 22 a 96 anos, mediana de 47,5 anos, 52.6% deles do sexo feminino.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Sensibilidade global do teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM - WAMA (presença de uma ou outra banda IgM ou IgG), para soros de casos com 7 ou mais dias de sintomas, foi 75% (IC 95% 67.5-81.3), sem diferença estatística em relação a sensibilidade informada pelo fabricante na comparação com RT-PCR (83,3%, $p=0.07$);
2. A especificidade observada para Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM - WAMA foi 97.4 (IC 95% 92.6-99.1)%, foram observadas três reações falso positivas entre 116 soros controles testados, todas elas devido a banda IgM, sendo as condições associadas a estes soros leishmaniose visceral, um dos casos co-infectado pelo HIV, além de um caso sem condição infecciosa definida, portador de hipotireoidismo;
3. A acurácia global do teste em soros de casos com mais de sete dias de sintomas foi estimada em 84.8% (IC 95% 79.9-88.7);
4. A sensibilidade do teste tende a aumentar com o aumento do número de dias a partir do primeiro dia de sintomas, sendo significativamente diferente entre os grupos até seis dias de sintomas, 7-14 e mais que 14 dias de sintomas, estimada em 32% (IC 95% 17.2-51.6); 63.5% (IC 95% 52.1-73.6) e 86.5% (IC 95% 76.9-92.5), respectivamente ($p<0.006$);
5. A sensibilidade do teste diferiu significativamente entre soros de casos com e sem critério para síndrome respiratória aguda grave:

77.7% (IC 95% 68.7-84.7) e 55.7% (IC 95% 44.1-66.7), respectivamente, $p=0.002$;

6. A concordância entre os resultados observados por três observadores independentes foi quase perfeita em todas as comparações ($>0,8$);

7. De acordo com o fabricante, a presença de banda de qualquer intensidade de cor deve ser interpretada como resultado positivo. Em muitos casos foram observadas bandas extremamente fracas necessitando de observação com auxílio de fonte luminosa (anexo).

COMENTÁRIOS DE NOSSA EMPRESA SOBRE ESTA AVALIAÇÃO

De todas as avaliações que o teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica foi submetido, esta foi a que mostrou uma sensibilidade menor do teste, embora sem diferença estatística em relação a sensibilidade informada na bula do teste na comparação com o RT-PCR. O teste mostrou especificidade elevada (97,4%), confirmando o encontrado em outros estudos, bem como melhora de sua performance com a evolução do tempo do início da sintomatologia.

Voltamos a afirmar que a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo de um teste sorológico devem ser sempre analisados através dos vários estudos realizados com o teste, uma vez que o painel de amostras utilizado pode determinar algumas variações na performance do teste, assim como o tamanho da amostragem também é fator importante nessas conclusões, ou seja, painel e quantidade de amostras podem determinar algumas variações nos índices de performance do teste.

Avaliação do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM contra o SARS-CoV-2 da WAMA Diagnóstica

Realizado no Laboratório Nacional de Microbiologia de Saúde Pública, Canadá

Data do relatório - 09 de julho de 2020

Sumário

As características de desempenho do teste rápido COVID-19 IgG/IgM foram avaliadas no Laboratório Nacional de Microbiologia (NML). Um total de 180 amostras de soro/plasma de pacientes com COVID-19 foram testadas usando esse teste e a sensibilidade do teste aumentou em pacientes com um período de tempo mais longo entre o início dos sintomas e a data da coleta da amostra. Para amostras coletadas > 14 dias após o início da sintomatologia, a sensibilidade foi de 93,0% (IC95% 87,1-96,7%). A reatividade cruzada foi observada quando 19 amostras de SARS-CoV1 foram executadas na porção IgG deste ensaio (73,7% com IC95% 48,8-90,9%), mas a especificidade foi de 100% (IC95% 95,5-100%) em outras 80 amostras negativas conhecidas (amostras controle).

Materiais e métodos

O teste de diagnóstico avaliado neste relatório foi testado contra 180 amostras positivas conhecidas para SARS-CoV2, bem como contra um conjunto de amostras de controle negativo pré-surto. Todas as amostras positivas conhecidas para SARS-CoV-2 foram coletadas de pacientes que apresentaram resultados positivos usando o teste de RT-PCR em amostras nasofaríngeas. Amostras de sangue foram obtidas de pacientes positivos para PCR na Colúmbia Britânica, Manitoba e Ontário e as datas da coleta variaram de 24 de março a 5 de junho de 2020.

As plataformas de PCR usadas para confirmar o diagnóstico de COVID-19 variaram entre os

diferentes laboratórios provinciais de saúde pública, mas cada laboratório confirmou a infecção por SARS-CoV-2 usando iniciadores e sondas contra o gene E. Os pacientes estavam doentes o suficiente para procurar atendimento médico e realizar testes diagnósticos, mas o espectro da doença clínica para cada paciente é atualmente desconhecido.

Um total de 14 pacientes forneceu amostras agudas e convalescentes (um paciente forneceu 2 amostras convalescentes), enquanto 161 amostras eram de pacientes individuais únicos. Amostras incluíram plasma (n = 37) e soro (n = 143), coletados em diferentes momentos ou dias após o início dos sintomas (intervalo: 3-111 dias). A morte de pacientes positivos variou de 21 a 98 anos (n = 180; média 64; mediana 65). De todos os pacientes (n = 180) havia mais homens (n = 108) do que mulheres (72).

As amostras de controle negativo foram amostras de plasma e soro coletadas antes de 2020. As amostras eram de várias fontes, incluindo a Pesquisa Canadense de Medidas de Saúde (25) ou foram consideradas negativas para o vírus da raiva (14), sífilis (19), vírus da hepatite A (11) ou HIV-1 (11). Também foi testado um conjunto de 19 amostras de soro de indivíduos infectados com SARS-CoV1 (coletadas em 2005). Todas as amostras foram congeladas quando enviadas para teste e, com exceção das amostras SARS-CoV1, a maioria foi armazenada a (-) 20 ou (-) 80 °C por apenas alguns meses.

No total, 279 testes foram usados na avaliação e o teste foi realizado em 1º de julho de 2020. Os resultados dos testes foram interpretados conforme descrito no folheto informativo, por dois operadores. Os operadores pontuaram cada cassete independentemente, mas foi alcançado um consenso sobre a presença ou ausência de bandas. Quando não foi possível chegar a acordo, o que não era frequente, o teste foi classificado como negativo.

RESULTADOS

As características de desempenho do Teste Rápido para Anticorpos IgG/IgM contra a COVID-19 estão resumidas na Tabela 1. No geral, a sensibilidade do ensaio melhorou em amostras de pacientes coletados > 14 dias após o início dos sintomas (93,0%). A especificidade do ensaio em amostras não-COVID foi excelente nas porções IgG e IgM do ensaio (100%). A reatividade cruzada com SARS-CoV1 não foi evidente na porção IgM (100% de especificidade), mas houve alguma reatividade na porção IgG do teste (especificidade de 73,7%).

Havia algumas limitações do painel de soro usado que deveriam ser consideradas. Por exemplo, embora alguns de nossos pacientes tenham sido hospitalizados, o curso clínico exato da infecção para cada paciente é desconhecido no momento e a gravidade da doença demonstrou afetar a resposta imune. Da mesma forma, a maioria dos nossos pacientes era de indivíduos mais velhos (> 64 anos de idade) e a idade e o estado imunológico subjacente podem ter afetado a produção de anticorpos. Finalmente, sabe-se que há considerável heterogeneidade na resposta imune em função da genética do hospedeiro ou de outros fatores, de modo que alguns indivíduos têm uma forte resposta humoral à infecção por SARS-CoV2, enquanto outros não. Todos esses fatores, sobre os quais atualmente não podemos controlar, podem ter afetado o desempenho do ensaio. Finalmente, o desempenho do ensaio provavelmente varia um pouco de laboratório para laboratório, devido às diferenças na composição do painel de soro usado e o desempenho geral seria mais bem determinado em testes realizados em vários laboratórios usando diferentes painéis de soro.

Do ponto de vista do usuário final, o ensaio foi fácil de usar e as instruções de uso foram claras e concisas. Relativamente poucos resultados dos testes foram contestados pelos dois operadores, no entanto, eles ocasionalmente observaram intensidade parcial ou desigual das bandas, particularmente da banda IgG, o que dificultou a interpretação em um pequeno número (n = 12) de cassetes de teste.

Avaliação do Teste Imuno-Rápido COVID-19 IgM/IgG da WAMA Diagnóstica							
	Sensibilidade				Especificidade		
	Dias do Início dos Sintomas						
	3 a 7	8 a 14	15 a 21	> 21	> 14	Não SARS	SARS-CoV-1
Anticorpo	N=20	N=32	N=18	N=110	N=128	N=80	N=19
IgM	70,0%	71,9%	88,9%	73,6%	75,8%	100%	100%
(% IC)	(45,7-88,1)	53,2-86,2)	(63,3-98,6)	(64,4-81,6)	(67,4-82,9)	(95,5-100)	(82,4-100)
IgG	45,0%	62,5%	88,9%	89,1%	89,1%	100%	73,7%
(% IC)	(23,1-68,5)	(43,7-78,9)	(65,3-98,6)	(81,7-94,2)	(82,3-93,9)	(95,5-100)	(48,8-90,9)
IgM + IgG	75,0%	75,0%	100%	91,8%	93,0%	100%	73,7%
(% IC)	(50,9-91,3)	(56,6-88,5)	(81,5-100)	(85,0-96,2)	(87,1-96,7)	(95,5-100)	(48,8-90,9)

Tabela 1. Desempenho do Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM

Novas Avaliações que o Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica vem sendo Submetido

COMENTÁRIOS DE NOSSA EMPRESA SOBRE ESTA AVALIAÇÃO

Nosso teste mostrou resultados coerentes com o que vimos observando em outros estudos, onde a sensibilidade e a especificidade aumentam consideravelmente em amostras coletadas após 14 dias do início dos sintomas, o que atende perfeitamente a aplicação do teste nesta fase da doença.

O estudo também deixa claro que o teste sorológico não substitui o teste de biologia molecular (RT-PCR) nas 2 primeiras semanas do início da sintomatologia, por não existir ainda, em alguns pacientes, níveis de anticorpos detectáveis, embora ele possa ajudar, quando aplicado junto ao teste molecular, a ampliar o diagnóstico da infecção recente.

Este estudo reforça o uso da sorologia como teste a ser usado no diagnóstico tardio da infecção ativa e no estabelecimento da soroprevalência ainda não conhecida na quase totalidade dos estados brasileiros, ajudando sobremaneira no estabelecimento de medidas de saúde pública. As informações obtidas com nosso teste atendem a todos os itens informados na seção desse artigo **“Por Que Os Testes Sorológicos São Importantes Na COVID-19?”**, sendo bastante útil, além do conhecimento da soroprevalência, no rastreamento de contatos, na velocidade da disseminação, na vigilância sorológica etc.

- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE: a WAMA Diagnóstica se credenciou junto a OMS para que seu teste Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM seja submetido a painel de referência de amostras daquela Instituição, onde participará um número limitado de fabricantes de testes sorológicos *“Point of Care”*, com o objetivo de normatizar a aplicação desses testes sorológicos a nível mundial, através do desenvolvimento de painéis de soros de referência.
- ESTUDO NO HOSPITAL BENEFICIÊNCIA PORTUGUESA: o Imuno-Rápido COVID-19 IgG/IgM da WAMA Diagnóstica vem sendo avaliado na Beneficência Portuguesa, na cidade de São Paulo, para medir sua performance em pacientes hospitalizados, em amostras colhidas em diferentes tempos do início da sintomatologia. O objetivo é conhecer o comportamento do teste nos pacientes que evoluem para a Síndrome Aguda Respiratória Grave (SARS) e os que se recuperam após desconforto respiratório leve a moderado.

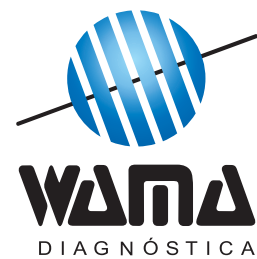


Tel: +55 16 3377.9977
SAC: 0800 772 9977



Rev.: 07/2020

 [wamadiagnostica](https://www.wamadiagnostica.com.br)
 atendimento@wamadiagnostica.com.br



Rua Aldo Germano Klein, 100 - CEAT, São Carlos/SP – Brasil



Constante Evolução