

As diferenças entre os testes disponíveis para COVID-19

Rodrigo Proto-Siqueira, PhD
Laboratório Antonello
27/05/2020

Quando nos dirigirmos a "testagem" para SARS-COV-2 (COVID-19) é de suma importância identificar o tipo de teste ao qual estamos nos referindo. Os testes possuem aplicações diferentes, e os resultados podem sofrer interferências de acordo com a metodologia de cada teste. As opções de testes são: os testes de RT-PCR (aqueles que pesquisam o vírus no nariz e orofaringe) e os testes sorológicos (aqueles que pesquisam anticorpos contra o vírus no sangue).

Qual o teste utilizado para o diagnóstico de doença aguda ou de portador assintomático do vírus?

Para a pesquisa do vírus em secreções, utiliza-se como teste de escolha o PCR em tempo real. É uma metodologia que detecta, no caso o COVID-19, o genoma do vírus na mucosa do nariz, da orofaringe, ou em pacientes com acometimento pulmonar, no aspirado da traqueia. pode detectar quantidades mínimas do vírus na amostra. É o mesmo princípio utilizado para a quantificação de carga viral de HIV em pacientes com AIDS. Entretanto, é importante salientar que cada indivíduo apresenta uma resposta diferente ao vírus e a sensibilidade clínica é maior aos quatro dias depois do aparecimento dos sintomas. Boa parte dos indivíduos positivos são assintomáticos e, por isso, alguns profissionais utilizam o teste para monitorar se houve contato ou se o paciente é portador do vírus.

Como funciona o PCR:

É um teste que amplifica uma região específica do genoma do vírus e pode ser utilizado para uma infinidade de propósitos, desde a amplificação de DNA de plantas, pesquisa de mutações no DNA de humanos, ou para a detecção de doenças infecciosas, como o vírus da hepatite C, o HIV e o COVID-19. O grande diferencial do teste é sua alta sensibilidade e especificidade (a taxa de falso positivo é próxima a zero). Alguns protocolos foram estabelecidos (kits) para o diagnóstico. Os mais utilizados são os preconizados pelo CDC (Centro de controle de doença, USA) e pelo Hospital Charité (Alemanha).

Quais as opções de testes sorológicos?

Para a pesquisa de anticorpos desenvolvidos contra o COVID-19 as opções são mais variáveis, tanto no tipo de anticorpo pesquisado quanto no método de análise empregado. Entender os tipos de anticorpos e os métodos, é fundamental para saber o que o resultado do teste aponta.

Em relação aos tipos de anticorpos contra o COVID-19:

Anticorpos do tipo IgG: são anticorpos desenvolvidos mais tardiamente e podem ser detectados, com maior sensibilidade, depois de 14 dias do contato com o covid-19. A detecção de IgG aponta que o indivíduo teve um contato prévio com o COVID-19, mais de 14 dias. São anticorpos que conferem memória imunológica para diversas doenças, e a presença de IgG para coronavírus ainda não pode ser totalmente associada com imunidade, mas alguns estudos em curso apontam que isso pode ocorrer.

Anticorpos do tipo IgM: são conhecidos como anticorpos de fase aguda e aparecem mais próximo aos sintomas. Normalmente são detectados depois de 7 dias do contato, ou dos sintomas de COVID-19. A detecção de IgM sofre interferentes e alguns casos positivos podem ser resultado de reação inespecífica (falso positivo).

Anticorpos do tipo IgA: também aparecem na fase aguda da doença, e por se tratar de doença de mucosas, os testes que detectam IgA são, a princípio, mais sensíveis que os de IgM.

Como entender para que serve cada teste e a interpretação dos resultados:

Siga sempre as orientações médicas e as normas da Secretaria Municipal de Saúde. O quadro abaixo é apenas para o entendimento dos testes e não para interpretação dos resultados sem ajuda de profissional qualificado.

	Resultado	Interpretação	Recomendação
TESTE VIRAL (teste molecular – PCR)	Positivo	<i>Provavelmente*</i> você ESTÁ com contaminação ativa pelo COVID-19 e pode contaminar outras pessoas	Mantenha o isolamento social e siga as recomendações da Secretaria Municipal de Saúde do seu município.
	Negativo	<i>Provavelmente*</i> você NÃO tem contaminação ativa pelo COVID-19	Se você tem sintomas, continue o monitoramento e siga as orientações médicas. Se não possui sintomas, só realize o teste novamente por orientação médica.

ANTI-IgG	REAGENTE (positivo)	<i>Provavelmente*</i> você TEVE contaminação ou contato com o COVID-19	Podem haver políticas de isolamento definidos pela secretaria de saúde.
	NÃO REAGENTE (negativo)	<i>Provavelmente*</i> você NUNCA TEVE contaminação ou contato com o COVID-19 (ou ainda não desenvolveu anticorpos, 15 dias depois do contato)	
ANTI-IgG e ANTI-IgM			<p>Objetivos: Pacientes sintomáticos na fase tardia (7 a 10 dias após sintomas).</p> <p>Quando realizar: IgM após 7 dias dos sintomas, IgG preferencialmente 15 dias</p> <p>Resultados indeterminados de IgM devem ser confirmados em nova amostra ou Realizar PCR em swab nasal para determinação da infecção.</p>
<p>Todos os resultados serão informados a Vigilância Epidemiológica Municipal e políticas de quarentena poderão ser aplicadas.</p>			

Quais as principais diferenças entre os métodos para a detecção de anticorpos?

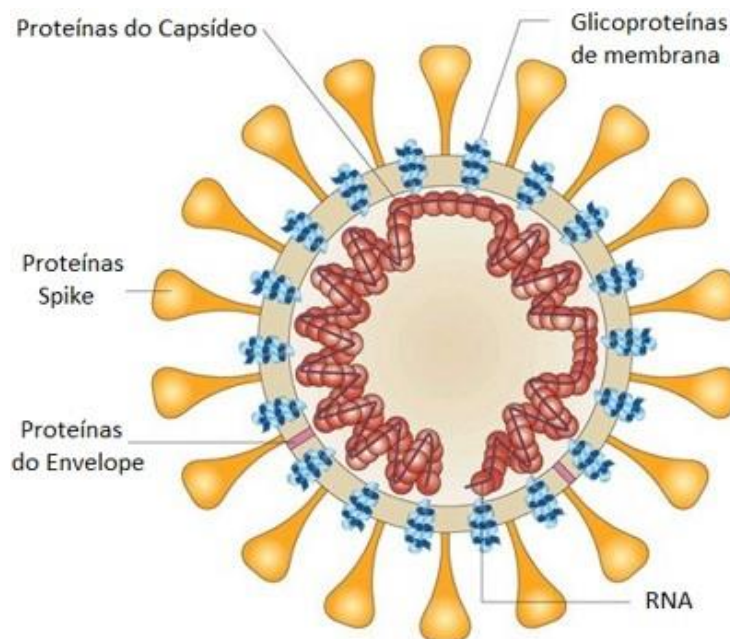
Existem, atualmente, 2 grandes alternativas para a detecção de anticorpos em larga escala: 1) os testes rápidos, e 2) os teste sorológicos do tipo ELISA (realizados em banco se sangue e laboratórios, por exemplo).

A terceira alternativa seriam os testes de neutralização. São testes bastante complexos, difíceis de serem realizados em larga escala e demandam uma estrutura bastante rigorosa para sua realização, pois utilizam vírus vivo em cultura. O teste consiste em colocar o sangue do indivíduo em contato com o vírus em cultura e avaliar a capacidade do sangue neutralizar o vírus. Caso ocorra a neutralização, é sinal que existem anticorpos e que o indivíduo está imune ao vírus. Infelizmente, não é possível sua realização em larga escala.

Além do método utilizado, o que mais pode interferir no desempenho do teste sorológico?

Sem dúvida a escolha do fragmento (proteína/antígeno) do vírus utilizado para a pesquisa do anticorpo. Esses testes utilizam antígenos do vírus, produzidos em laboratórios, nos quais os anticorpos produzidos pelo indivíduo se ligam e são, conseqüentemente, detectados.

Um artigo muito interessante, publicado por Rafael Assis (Universidade da Califórnia) demonstrou a variabilidade de resultados sorológicos, em pacientes sabidamente positivos para o COVID-19, com teste do tipo ELISA que utilizavam diferentes antígenos do COVID-19. O artigo aponta que os antígenos da coroa do coronavírus (spike em inglês) conhecidos como S1 e S2, quando utilizados em conjunto, são a melhor escolha para compor o teste de pesquisa de anticorpos. Além disso, sabemos que os anticorpos produzidos contra a coroa do coronavírus são, normalmente, relacionados com a capacidade de promover defesa contra novas infecções (imunidade). **Figura 1.**



Testes rápidos para COVID-19:

O Brasil vivenciou a evolução das negociações e da aprovação de muitos testes rápidos para COVID-19 no mês de março. Até o dia 08 de maio de 2020, havia 22 testes rápidos com registro na ANVISA. Algumas marcas foram devidamente validadas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz), e os resultados foram bastante satisfatórios. Entretanto, diversos testes a venda não foram devidamente validados e o desempenho conhecido é apenas aquele revelado pelo fabricante. Um estudo conduzido na Universidade da Califórnia (<https://covidtestingproject.org/>) comparou o desempenho de 9 diferentes marcas de teste rápido em indivíduos sabidamente positivos para COVID-19 em dias sequenciais após a infecção. Na tabela 1 observa-se que a sensibilidade máxima, para a detecção de IgG, é 20 dias depois da infecção. É possível verificar também que, mesmo depois de 20 dias da infecção, algumas marcas foram capazes de detectar anticorpos em apenas 66% dos casos. Há grande variabilidade nos resultados quando se compara diferentes fornecedores.

Quando o teste rápido é realizado por profissionais devidamente treinados e utiliza-se marcas com validação reconhecida, os resultados são satisfatórios. A marca utilizada pelo Ministério da Saúde, Wondfo, apresentou um bom desempenho nos ensaios de validação. Entretanto diversas outras oferecidas no ambiente privado possuem resultados bastante controversos. Além disso, os testes realizados com sangue da ponta do dedo sofrem impactos por interferentes, como a lise das células vermelhas.

Comparação em 8 marcas de Testes rápidos para a detecção de IgG em pacientes positivos para COVID-19

Tabela: Resumo dos Resultados.

Dias após o contato	Sensibilidade (%)		
	Media	Pior Marca	Melhor Marca
1 a5	24	18	29
6 a 10	56	47	66
11 a 15	72	60	85
16 a 20	67	64	71
>20	83	66	90

Tabela 2: Análise comparativa na integra

Assay	Days Since Onset	Supplier									
		Biomedomics	Bioperfectus	Decombio	DeepBlue	Innovita	Premier	Sure-Bio	UCP Biosciences	VivaDiag	Wondfo
IgM	1-5 days	25,9%	39,3%	30,8%	42,9%	14,8%	35,7%	10,7%	25,0%	28,0%	
	6-10 days	61,1%	74,3%	66,7%	77,8%	33,3%	71,4%	42,9%	58,3%	62,9%	
	11-15 days	75,8%	82,4%	87,9%	82,4%	38,7%	82,4%	64,7%	76,5%	86,7%	
	16-20 days	84,2%	84,2%	77,8%	84,2%	30,8%	84,2%	73,7%	78,9%	78,9%	
	>20 days	81,8%	100,0%	90,9%	90,9%	16,7%	90,9%	72,7%	90,9%	90,0%	
IgG	1-5 days	22,2%	25,0%	26,9%	21,4%	25,9%	21,4%	17,9%	25,0%	28,0%	
	6-10 days	52,8%	65,7%	66,7%	50,0%	47,2%	51,4%	54,3%	50,0%	62,9%	
	11-15 days	69,7%	79,4%	87,9%	61,8%	78,1%	64,7%	73,5%	73,5%	83,3%	
	16-20 days	73,7%	73,7%	77,8%	78,9%	69,2%	73,7%	73,7%	73,7%	73,7%	
	>20 days	81,8%	90,0%	90,9%	81,8%	66,7%	81,8%	90,9%	81,8%	90,0%	
IgG +/- IgM	1-5 days	29,6%	39,3%	30,8%	42,9%	25,9%	35,7%	17,9%	25,0%	28,0%	38,5%
	6-10 days	63,9%	77,1%	66,7%	77,8%	55,6%	71,4%	54,3%	58,3%	62,9%	66,7%
	11-15 days	78,8%	88,2%	87,9%	82,4%	78,1%	85,3%	73,5%	79,4%	86,7%	84,4%
	16-20 days	89,5%	89,5%	77,8%	89,5%	69,2%	89,5%	78,9%	78,9%	78,9%	89,5%
	>20 days	81,8%	100,0%	90,9%	90,9%	83,3%	90,9%	90,9%	90,9%	90,0%	81,8%

Testes tipo ELISA para COVID-19

Os testes tipo ELISA, diferentemente dos testes rápidos, são realizados em laboratório em um equipamento automatizado que realiza a leitura dos resultados. Geralmente são mais sensíveis que os testes rápidos e permitem uma estimativa da quantidade de anticorpos produzidos. A reação ocorre em um equipamento com temperatura controlada e a interpretação do resultado é mais segura (pois não depende da interpretação do olho humano). Um estudo, publicado pelo grupo da Dra Fatima Amanat, Escola de Medicina Mount Sinai, Nova York, demonstrou uma excelente correlação entre o teste de ELISA com o teste de neutralização do vírus. Os resultados, ainda que preliminares, sugerem que os indivíduos com resultados positivos para IgG, pelo teste de ELISA, possam estar imunes para o COVID-19.

Comparação entre testes rápidos e ELISA para COVID-19

ELISA	Teste Rápido
Leitura automatizada e mais precisa	Leitura manual e operador dependente (erro na leitura visual de resultados fracos)
Resultados similares entre diferentes fornecedores	Elevada variabilidade de sensibilidade (de 50% a 81%) entre diferentes marcas
Maior sensibilidade e reprodutibilidade	Menor sensibilidade de especificidade

Teste capaz de quantificar os anticorpos	Teste qualitativo
Realizado em soro/plasma: material com menos interferentes	Realizado com sangue total da ponta do dedo e pode sofrer interferência pela hemólise
Controle interno positivo e negativo em cada ensaio (confiabilidade)	Controle de qualidade apenas do lote de reagentes
Realizado em condições ideais e temperatura. Reagentes mantidos em temperatura controlada	Realizado em condições de temperatura ambiente.
Sensibilidade de ~90% (entre 11 e 15 dias após contato)*	Sensibilidade de ~77% (entre 11 e 15 dias após contato) *
Utilizado pelos principais laboratórios de diagnóstico do mundo (Quest e Mayo Clinic, por exemplo)	Rapidamente aprovados pela Anvisa e ainda em fase de testes nos principais laboratórios de diagnóstico do Brasil