



---

## A experiência da maior empresa do Brasil na validação de testes laboratoriais

---



**Dra. Claudia Meira**

Patologista Clínica  
Superintendente de Operação  
Médica de Análises Clínicas – Dasa

art.02

# A experiência da maior empresa do Brasil na validação de testes laboratoriais

---

**Dra. Claudia Meira**

Em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 uma emergência de saúde pública de interesse internacional. Desde então, nos preocupamos em oferecer testes diagnósticos acurados e precisos, que possam complementar com segurança os dados clínicos, além de contribuir com os profissionais médicos neste grande desafio que o cenário da saúde tem enfrentado.

Hoje, os testes disponíveis estão distribuídos em dois grandes grupos: os que fazem a identificação do RNA viral por metodologia de biologia molecular; e os de detecção de anticorpos por ensaios imunológicos.

Por ser uma doença recente, a COVID-19 é um grande desafio para as comunidades científica e laboratorial em razão da diversificação da resposta imunológica, ou seja, é dependente do hospedeiro. Alguns pacientes produzem anticorpos poucos dias após o início dos sintomas e outros depois de 14 ou até mesmo após 20 dias de sintomas.

O cenário de pandemia fez com que o FDA (Food and Drug Administration) e a Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovassem testes diagnósticos em emergência. Cabe agora aos laboratórios realizarem seus estudos de validação para garantir que o procedimento, sistema, equipamento ou método empregado apresente o desempenho e os resultados esperados para a finalidade do uso. Esses processos devem, obrigatoriamente, ser realizados por cada fabricante para garantir, quando aplicados, acurácia, precisão, sensibilidade e especificidade. Os testes "in house" devem seguir os protocolos de validação com dados de aplicabilidade ao uso e desempenho.

"A utilidade clínica de um teste depende da prevalência da doença na população testada.

As respostas aos estudos de desempenho variam de acordo com a prevalência, impactando no estudo do VPN (valor preditivo negativo) e do VPP (valor preditivo positivo), índices que avaliam a chance de um resultado positivo indicar a presença da doença e de o resultado negativo indicar a ausência."

Supondo que todos os outros fatores permaneçam constantes, o VPP aumentará com o aumento da prevalência, e o VPN diminuirá com o aumento da prevalência.

A sensibilidade e a especificidade estão diretamente relacionadas à comparação do método em estudo com outro "gold standard", como avaliar os resultados da sorologia tendo como referência o RT-PCR detectado ou não detectado. São termos que correspondem ao percentual de concordância de positivos e negativos.

Vale ressaltar que a especificidade corresponde ao total de casos verdadeiramente positivos (PCR detectados) em relação ao total de positivos encontrados no método em estudo (sorologia). A sensibilidade corresponde ao total de casos verdadeiramente negativos (PCR não detectado) em relação ao total de negativos encontrados no método em estudo (sorologia).



# SARS-CoV-2

---

## VALIDAÇÃO DO SARS-CoV-2

Conhecer a estrutura do SARS-CoV-2 é importante para entender como os testes são desenvolvidos. O SARS-CoV-2 possui na sua estrutura:

<b>Proteína M:</b>	<b><i>Dupla camada lipídica</i></b>
<b>A glicoproteína S (spike) é uma proteína transmembrana, estrutural</b>	<b><i>S1: responsável pela ligação no receptor da célula hospedeira</i></b>
	<b><i>S2: contém elementos necessários para a fusão da membrana celular</i></b>

- Dentro do envelope há múltiplas cópias de nucleocapsídeos proteicos (N), às quais estão ligadas ao RNA.

## TIPOS DE TESTES

O RT-PCR consiste na detecção do RNA do vírus SARS-CoV-2 em amostras de secreção respiratória (naso/orofaringe, lavado brônquico ou secreção traqueal) por metodologia de biologia molecular com amplificação de regiões específicas dos genes E e N e utilização de RNaseP como controle endógeno.

O teste de RT-PCR passa por etapas de extração de RNA, amplificação feita por meio de primers do vírus, identificação, análise e liberação, o que demanda um tempo razoável, mas totalmente necessário, para que todas as etapas sejam bem concluídas. Com o objetivo de minimizar esse tempo, lançamos também para os hospitais um teste comercial de POCT (point of care), igualmente submetido a estudo de verificação de desempenho, com índice de correlação de 92% e índice Kappa de 0,85 comparado com o RT-PCR ("in house"); dados aceitáveis com base na especificação esperada de >90% e >0,70, respectivamente.

A validação do nosso teste foi desenvolvida pela área de P&D sob protocolo para diagnóstico qualitativo do SARS-CoV-2 criado pela Charité University de Berlim, na Alemanha, e protocolo da Hong-Kong University; ref., validados com controles positivos em parceria com o Instituto de Medicina Tropical (IMT) da Universidade de São Paulo (USP). Seguiu, ainda, as diretrizes de validação denominadas Laboratory Developed Tests (LDTs), conforme as regras preconizadas pelo College of American Pathologists (CAP), o programa internacional de acreditação de sistema da qualidade do qual participamos.

No Brasil, há dois grandes grupos de testes imunológicos: os sorológicos e os testes rápidos. Os exames disponíveis comercialmente usam as metodologias CLIA (quimioluminescência por captura), ELISA (enzima imunoensaio) e Cromatografias (fluxo lateral – colorimétricos) para pesquisa de anticorpos totais ou IgG associado a IgA ou IgM. Eles foram autorizados para uso comercial pela Anvisa sob a condição da entrega de um dossiê técnico documental pelo fabricante que permite a avaliação da confiabilidade dos resultados e da efetividade diagnóstica do produto.

"No entanto, de acordo com a Resolução RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005, e com as normas de Acreditação CAP e PALC, equipamentos e reagentes que afetam a qualidade dos exames laboratoriais não devem ser utilizados até que sejam verificados ou validados internamente, e que haja a comprovação de que atendem às especificações ou aos requisitos definidos de acordo com os procedimentos analíticos a eles vinculados."

A verificação de desempenho de um teste é uma prática para laboratórios acreditados pelo College of American Pathologists (CAP) e/ou Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos (PALC), como é o nosso caso. Ou seja, todo novo equipamento e/ou novo teste e/ou novo kit deve passar por processos de avaliação, no mínimo de exatidão, precisão e, nos casos dos testes qualitativos, sensibilidade e especificidade, valor preditivo negativo e valor preditivo positivo.

**"Nossos dados de sensibilidade e especificidade foram bem variáveis e, geralmente, inferiores aos descritos nos dossiês (bulas) pelos fabricantes. No entanto, quando avaliamos a resposta imunológica na linha do tempo, verificamos que os resultados do nosso estudo de verificação foram bem parecidos com os achados na literatura, que descreve um aumento de sensibilidade a partir de 7 a 10 dias após o início dos sintomas."**

Em estudo realizado com 91 pacientes internados com COVID-19, observamos sensibilidade geral para o método de CLIA IgM de 73,9% e IgG de 56%, sendo que a maioria das amostras de soro estudadas tinham menos de sete dias de início dos sintomas. Quando reavaliamos a sensibilidade na linha do tempo, ou seja, acima da janela imunológica, verificamos uma sensibilidade de 82% para IgM e 86,6% para IgG.

Esses achados corroboram que as sorologias realizadas nos primeiros dias de início dos sintomas podem apresentar resultados falso negativos. Os testes cromatográficos também apresentaram variações nas performances e seguem a recomendação de serem realizados após a primeira semana do início dos sintomas. Observamos VPN baixo (32% para alguns testes) com duas causas prováveis: a baixa prevalência da doença na população em geral, principalmente pela política de isolamento social e pela falta de pesquisa acerca da "imunidade de rebanho".

Os testes rápidos se diferenciam tecnicamente dos testes sorológicos devido à metodologia: os sorológicos são realizados em amostras de soro e em equipamentos que detectam anticorpos por meio de reação enzimática ou medidas de luminância. Portanto, os sorológicos são mais sensíveis, e os anticorpos podem ser quantificados com maior precisão nos resultados.

Nossa amostragem do estudo de verificação nos testes sorológicos e cromatográficos contemplou inicialmente amostras positivas e negativas, tendo como referência a realização de RT-PCR feitos em secreção de naso e orofaringe. Além destes, também utilizamos amostras de soro de pacientes que foram coletadas em 2019, antes de a COVID-19 ser notificada no Brasil.

Os testes rápidos também apresentam reação antígeno-anticorpo por migração (lateral flow) em uma placa de celulose, porém a leitura desta reação é colorimétrica e sofre mais interferência que os sorológicos, como preparo do local da punção capilar, tempo de reação e leitura visual da coloração que é, portanto, operador dependente.

Nossos estudos de verificação comparam amostras de soro e de sangue capilar para avaliar a equivalência dos resultados e assegurar que ambas podem ser utilizadas, além de levar em conta os resultados do RT-PCR.

Tanto para os testes sorológicos quanto para os testes rápidos, observamos uma sensibilidade geral baixa que melhora de 7 a 10 dias após o início dos sintomas, corroborando o que identificamos na literatura e na experiência vivenciada por outros países.

Concluimos, então, que os testes de pesquisa de anticorpos devem ser utilizados após este período, preferencialmente depois de 14 dias, em razão da variabilidade de resultados que temos observado como resposta ao novo SARS-CoV-2. Um resultado negativo não exclui a doença e, em caso de contato com pacientes com COVID-19 confirmada, deve-se repetir o teste após alguns dias para avaliar eventual soroconversão.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLSI EP9-A3 - Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline, 2013.
2. P15-A3 - User verification of precision and estimation of bias; approved guideline, 2014.
3. EP12-A2 - User protocol for evaluation of qualitative test performance; approved guideline, 2008.
4. Padoan et al.: Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG; Clin Chem Lab Med 2020
5. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19, Nat ure Medicine | [www.nature.com/naturemedicine](http://www.nature.com/naturemedicine)
6. Serological assay for SARS-CoV-2 infeccion disease: benefits, limitations and perspetives; IMAJ, vol22, abril 2020.
7. Meira, Claudia de Oliveira Derliane, Qualidade em Laboratório Clínico, 156 Perguntas e Respostas, Ed. Sarvier, 1ª Edição, 2012.