

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA
E MEDICINA TROPICAL

MURILO SOARES COSTA

INVESTIGAÇÃO DO SARS-COV-2 PARA RASTREAMENTO DA COVID-19 POR
MEIO DA RT-PCR EM *POOL TESTING*

BELO HORIZONTE

2022

MURILO SOARES COSTA

**INVESTIGAÇÃO DO SARS-CoV-2 PARA RASTREAMENTO DA COVID-19 POR
MEIO DA RT-PCR EM *POOL TESTING***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde. Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Linha de pesquisa: Infecções virais: HIV/AIDS, HTLV-I/II e outros vírus.

Orientador: Prof. Dr. Unai Tupinambás.

BELO HORIZONTE

2022

C837i Costa, Murilo Soares.
Investigação do SARS-CoV-2 para rastreamento da COVID-19 por meio da RT-PCR em Pool Testing [recursos eletrônicos]. / Murilo Soares Costa. - Belo Horizonte: 2022.
130f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Unaí Tupinambás.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Coronavirus. 4. Diagnóstico. 5. Pandemias. 6. Dissertação Acadêmica. I. Tupinambás, Unaí. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QW 168.5.C8

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL
ATA DE DEFESA DE TESE

Às **08:30** horas do dia 16 de dezembro de 2022, defesa híbrida na sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a 214ª defesa de tese de **MURILO SOARES COSTA**, número de registro 2020712231, graduado no curso de ENFERMAGEM, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor **UNAÍ TUPINAMBÁS**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROFA. LORENZA NOGUEIRA CAMPOS DEZANET (UNIFENAS - CAMPUSBH)**, **PROF. ISRAEL MOLINA ROMERO (FIOCRUZ-CPQRR - MG)**, **PROFA. VIVIANE DE SOUZA ALVES (UFMG)**, **PROFA. MARIA DO CARMO BARROS DE MELO (UFMG)**, **PROF. UNAÍ TUPINAMBÁS – ORIENTADOR (UFMG)**. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"Investigação do SARS-CoV-2 para rastreamento da COVID-19 por meio da RT-PCR em pool testing"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a **Tese de Doutorado**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Lorenza Nogueira Campos Dezanet, Usuária Externa**, em 16/12/2022, às 14:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Unai Tupinambas, Professor do Magistério Superior**, em 16/12/2022, às 17:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Israel Molina Romero, Usuário Externo**, em 16/12/2022, às 19:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Viviane de Souza Alves, Professora do Magistério Superior**, em 19/12/2022, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria do Carmo Barros de Melo, Coordenador(a)**, em 19/12/2022, às 15:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1936302** e o código CRC **832CFACA**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Dra. Isabela Almeida Pordeus

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Profa. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

VICE-DIRETORA: Profa. Dra. Cristina Gonçalves Alvim

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Dra. Eli Iola Gurgel Andrade

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

VICE-COORDENADOR: Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Junior

MEMBROS DO COLEGIADO

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Profa. Maria do Carmo Pereira Nunes

Profa. Mariana Costa Duarte

Prof. Unai Tupinambás

Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior

Camila Simões de Freitas – Representante Discente

Dedico essa tese as diversas vidas ceifadas pelo Coronavírus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo, pelos momentos difíceis que me fizeram valorizar os bons momentos, por me abençoar e permitir estudar na Universidade que tanto sonhei desde novo e por colocar pessoas boas que me ajudaram nesta jornada até aqui.

Aos meus pais que sempre me incentivam, investiram e sonharam junto comigo, vocês são fundamentais em minha vida, sempre terei muito orgulho da minha mãe, Indiária Soares Costa, técnica em enfermagem e do meu pai, Paulo Roberto Teixeira Costa, pintor residencial.

Aos meus familiares que me apoiaram em diversas situações da minha vida; ao meu irmão Danilo Soares Costa, por me inspirar em alguns momentos, farmacêutico e mestre em Biotecnologia pela UFES, aos meus sobrinhos Otávio Augusto Viana Soares e Mateus Viana Soares, por serem minha alegria externada, as minhas avós Ana Anísia Teixeira Costa e Terezinha Gomes do Nascimento, as minhas tias Cleonice Soares, Cleide Soares, Noeme Soares e Elenice Soares por serem verdadeiras tias e dar apoio de diversas formas ao meu irmão e a mim.

Aos meus amigos, que são pessoas que escolhi para serem uma segunda família, e estiveram comigo na alegria e na tristeza, na saúde e na doença; meus amigos de infância: Thales Souza Liberato e família, Júlio César Campos de Oliveira Stauffer de Andrade e família, Henrique Bernardo de Almeida e família, Felipe Liandro e família, Thales Matos Amaral, Ana Paula Costa Velten e família, Larissa Weberling e família, Markeline Meira e família. Aos amigos da época da graduação: Lilian Luttig Kister Cardoso, Rodrigo Leite dos Santos, Joelma Bohnem e Jaiane Bernardes Falquete.

Agradeço a pessoas que me incentivaram de confiaram no meu potencial quando eu mesmo duvidei, a Dra. Bruna Aguiar e a MSc. Nayra Fernandes, muito obrigado por me incentivarem a tentar o doutorado direto; e incluída neste grupo de incentivo agradeço imensamente a Dra. Nathalia Sernizon por tudo, em especial por todas as dicas, conversas e incentivos.

Ao prof. Unáí Tupinambás por me acolher e me aceitar como aluno de doutorado mesmo sem me conhecer, obrigado por ser tão humanizado, gentil e excelente orientador, sem o doutor, o meu sonho não seria concretizado.

RESUMO

Da descoberta do coronavírus em 1964 até a contemporaneidade, o diagnóstico laboratorial do vírus é uma importante ferramenta para detecção de novos casos, acompanhamento da série histórica e planejamento de ações de acordo com a incidência da doença. O *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) é o agente infeccioso responsável pela pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), ocorrendo casos assintomáticos infectados, leves, moderados, graves e óbitos. O diagnóstico considerado padrão-ouro para detecção do SARS-CoV-2 é a reação em cadeia pela polimerase acoplada à transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR), que ocorre por meio da extração do ácido ribonucleico (RNA) e tem um alto custo monetário. Porém, o método diagnóstico desenvolvido na segunda Guerra Mundial, conhecido como *pool testing*, visa agrupar mais de duas amostras e utilizar os reagentes como se fossem para uma amostra, caso o *pool* de amostras for detectável/positiva, deve-se fazer os exames de forma individual para saber qual ou quais amostras foi/foram detectáveis, e caso o *pool* for não detectável/negativo, todas as amostras estão não detectáveis, causando assim uma otimização em recursos materiais e financeiros. O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o método *pool testing* na RT-PCR para investigação do SARS-CoV-2 em pacientes com síndrome gripal e em assintomáticos. No método tiveram as amostras coletadas na UPA Centro Sul de casos suspeitos da COVID-19 e em acadêmicos de medicina no período do internato sem sinais e sintomas. As amostras foram analisadas por meio da RT-qPCR por meio do *pool testing* entre o período de setembro de 2020 a abril de 2021. Entre os resultados, dos 1.358 participantes examinados da UPA por meio de 504 *pools* com agrupamento de amostras que variou de 3 a 16. Entre os *pools* 33,7% foram não detectáveis, e no geral 32,62% das amostras individuais estavam detectáveis para o SARS-CoV-2. Entre os pesquisados 56,7% eram do sexo feminino, a faixa etária de maior busca pelo exame foi entre 18 a 39 anos, porém que apresentou maior porcentagem de positividade foram pessoas acima de 70 anos, com 48,1%. Já entre os acadêmicos de medicina foram realizados 15 *pools* com 10 amostras e 1 *pool* com 4 amostras (total = 154 participantes), sendo todos os *pools* com resultado não detectável, 54,7% eram do sexo masculino. Desta forma, o *pool testing* se demonstra o um método exequível e viável para o diagnóstico do SARS-CoV-2, em especial em baixa prevalência, como em casos assintomáticos, leves e moderados, reduzindo custos e otimizando recursos.

Palavras-chaves: COVID-19; SARS-CoV-2; pool testing; diagnóstico; pandemia.

ABSTRACT

From the discovery of the coronavirus in 1964 to the present day, laboratory diagnosis of the virus is an important tool for detecting new cases, monitoring the historical series and planning actions according to the incidence of the disease. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the infectious agent responsible for coronavirus disease 2019 (COVID-19) and consequently the pandemic, with asymptomatic infected, mild, moderate, severe cases and deaths occurring worldwide. The diagnosis considered the gold standard for the detection of SARS-CoV-2 is the real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), which occurs through the extraction of ribonucleic acid (RNA) and has a high monetary cost. However, the diagnostic method developed in the Second World War, known as pool testing, aims to group more than two samples and use the reagents as if they were for a sample, if the pool/grouping of samples is detectable/positive, the exams individually to know which samples were/were detectable, and if the pool is undetectable/negative, all samples are undetectable, thus causing an optimization in material and financial resources. The overall objective of this research was to evaluate the expansion of RT-qPCR testing in people for SARS-CoV-2 investigation using pool testing. In the method, samples were collected at the UPA Centro Sul from suspected cases of COVID-19 and from medical students during the internship without signs and symptoms. The samples were analyzed through RT-qPCR through pool testing between the period of September 2020 to April 2021. Among the results, of the 1,358 UPA participants examined through 504 pools with sample grouping ranging from 3 to 16. Among pools 33.7% were undetectable, and overall 32.62% of individual samples were detectable for SARS-CoV-2. Among those surveyed, 56.7% were female, the age group most searched for the test was between 18 and 39 years old, but those who showed the highest percentage of positivity were people over 70 years old, with 48.1%. Among the medical students, 15 pools with 10 samples and 1 pool with 4 samples (total = 154 participants) were performed, with all pools with undetectable results, 54.7% were male. In this way, pool testing proves to be a feasible and viable method for the diagnosis of SARS-CoV-2, especially in low prevalence, such as asymptomatic, mild and moderate cases, reducing costs and optimizing resources.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; pool testing; diagnosis; pandemic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens do coronavírus por meio de microscopia eletrônica retiradas em tempos diferentes	21
Figura 2 – Estrutura do SARS-CoV-2	22
Figure 3 – Organização do genoma dos betacoronavírus	23
Figura 4 – Distribuição do total de casos de covid-19 entre os 20 países com maior número de casos.	24
Figura 5 – Distribuição do total de casos óbitos de covid-19 entre os 20 países com maior número de casos	25
Figura 6 – Distribuição dos novos registros de casos por covid-19 por semana epidemiológica de notificação, Brasil, 2020-22	25
Figura 7 – Distribuição dos novos registros de óbitos por covid-19 por SE de notificação, Brasil, 2020-22	26
Figura 8 – Estratégia de realização da RT-qPCR em <i>pool testing</i>	37
Figure 9: Study eligibility flowchart	45
Figura 10 – Fluxograma para composição da amostra do estudo, composta de estudantes do 9º ao 12º períodos do curso de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, cursando estágios hospitalares obrigatórios, Belo Horizonte, 2021	79

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Table 1 – Characteristics of the studies included in the integrative review regarding COVID-19 diagnostics.	47
Table 2 – Main characteristics of the pools by studies included in this review.	50
Tabela 3 – Caracterização do diagnóstico laboratorial, sociodemográfico, clínico, hábitos durante a pandemia e situação da renda em suspeitos leves e moderados da COVID-19 atendidos na UPA Centro-Sul de Belo Horizonte, 2020-2021 (n=1.358).	62
Tabela 4 – Custos, em reais, dos materiais e reagentes para realização do procedimento adotado no presente estudo, comparado com o procedimento habitual e outros cenários hipotéticos, para a testagem de estudantes do 9º ao 12º períodos do curso de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, cursando estágios hospitalares obrigatórios, Belo Horizonte, 2021.	85
Quadro 1 – Estimativa de tamanhos ótimos de <i>pools</i> para realização de RT-PCR para SARS-CoV-2 a segundo a prevalência de COVID-19 na comunidade.	78

LISTA DE SIGLAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CECOVID	Centro Especializado em COVID-19
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i> ou Doença pelo coronavírus 2019
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CT-Vacinas	Centro de Tecnologia de Vacinas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Envelope
EMBASE	<i>Excerpta Medica</i> database
EPI	Equipamentos de proteção individual
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LILACS	Literatura Latino- Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
M	Glicoproteína de membrana
MEDLINE	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i>
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Quadro de Leitura Aberto
PR	Paraná
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RdRp	Gene da polimerase de RNA dependente da RNA
RS	Rio Grande do Sul
RNA	Ácido ribonucleico

RT-PCR/	<i>Real time reverse transcription polymerase chain reaction</i> ou Transcrição
RT-qPCR	reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real
S	<i>Spike</i> ou proteína de pico
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPA	Unidade de Pronto Atendimento
2019-nCov	Novo Coronavírus 2019
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	13
2 INTRODUÇÃO.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DO CORONAVÍRUS.....	20
3.2 EPIDEMIOLOGIA DA COVID-19.....	24
3.3 TESTES DIAGNÓSTICOS.....	27
3.3.1 <i>Pool testing</i>	29
4 OBJETIVOS.....	30
4.1 OBJETIVO GERAL.....	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	31
5.2 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	31
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	31
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	32
5.5 AMOSTRAGEM.....	32
5.6 COLETA DE DADOS.....	33
5.7 DESCRIÇÃO DO <i>POOL TESTING</i>	35
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1 ARTIGO 1.....	39
6.2 ARTIGO 2.....	59
6.3 ARTIGO 3.....	72
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
APÊNDICE A.....	98
APÊNDICE B.....	100
APÊNDICE C.....	102
APÊNDICE D.....	112
APÊNDICE E.....	118
APÊNDICE F.....	123

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Na história, a sociedade já foi acometida por inúmeras doenças infecciosas, algumas ocorrendo em um determinado limite geográfico, caracterizando um surto, entretanto em outras situações ocorreram casos globalmente, manifestando uma pandemia.

Em uma dessas emergências sanitárias mundial está a detecção de casos da doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19), os primeiros relatos são de dezembro de 2019. Foi necessário compreender a história natural da doença e propor medidas de combate e controle da infecção; acompanhando os números de casos leves, moderados, graves e óbitos proveniente desta moléstia.

Aumentar a testagem da população contribuiria para o controle da pandemia. Em contrapartida, o exame padrão-ouro para diagnóstico da COVID-19 é o teste molecular, isto é, a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Esse método diagnóstico tem um custo elevado, em especial em países em desenvolvimento, por esse motivo, houve a proposta de processar as amostras em agrupamento ou *pool testing*, o que justificou a realização dessa pesquisa, sendo um estudo inédito na América do Sul.

O interesse em pesquisar sobre a COVID-19 ocorreu no início da pandemia, pois eu era professor de uma faculdade privada do Espírito Santo e ministrei alguns treinamentos gratuitos sobre paramentação e desparamentação de equipamentos de proteção individual (EPI), devido a isso fui convidado para trabalhar no Núcleo de Educação Permanente do Hospital Estadual Roberto Arnizaut Silvaes; porém vi a oportunidade de tentar o doutorado para aprender um pouco mais sobre esta doença infecciosas contemporânea. Além de já ter coordenado o

programa municipal de controle e combate à hanseníase e tuberculose de São Mateus/ES e lecionar a disciplina Enfermagem nos Cuidados às Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Este trabalho está inserido na linha da pesquisa infecções virais: HIV/AIDS, HTLV-I/II e outros vírus do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Durante o período do doutorado dados parciais foram apresentados no:

- 6º Encontro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical;
- 7º Encontro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical;
- 8º Encontro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical;
- 1º Congresso Virtual de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde;

Houve a aprovação até o momento de três artigos tratando diretamente o tema pesquisado, os dois primeiros artigos abaixo estão nos resultados e o último nos apêndices:

COSTA, M. S.; GUIMARAES, N. S.; ANDRADE, A. B.; VAZ-TOSTES, L. P.; OLIVEIRA, R. B.; SIMOES, M. S.; GELAPE, G. O.; ALVES, C. C. R. L.; MACHADO, E. L.; FONSECA, F. G.; TEIXEIRA, S. M. R.; SATO, H. I.; TAKAHASHI, R. H. C.; TUPINAMBAS, U.. Detection of SARS-CoV-2 through pool testing for COVID-19: an integrative review. SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. REVISTA, v. 54, p. e0276-2021, 2021.

GUIMARAES, N. S.; **COSTA, M. S.;** MACHADO, E. L.; SATO, H. I.; AMARAL, E. C.

M. E.; ARIVABENE, R. G.; LOURENCO, K. L.; TUPINAMBÁS, UNAÍ; FONSECA, F. G.; TAKAHASHI, R. H. C.; TEIXEIRA, S. M. R.; ALVES, C. C. R. L.. Autocoleta de *swab* nasofaríngeo e teste molecular em *pool testing* como estratégias para detecção de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2): viabilidade em estudantes de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2021. EPIDEMIOLOGIA E SERVICOS DE SAUDE, 2022.

COSTA, MURILO S.; SATO, HUGO I.; ROCHA, RAISSA P.; CARVALHO, ALEX F.; GUIMARÃES, NATHALIA S.; MACHADO, ELAINE L.; ALVES, CLAUDIA R. L.; TEIXEIRA, SANTUZA M. R.; TAKAHASHI, RICARDO H. C.; TUPINAMBÁS, UNAÍ; DA FONSECA, FLÁVIO G.. Adjusting the Cut-Off and Maximum Pool Size in RT qPCR Pool Testing for SARS-CoV-2. *Viruses-Basel*, v. 13, p. 557, 2021.

Além de outros artigos foram submetidos ou publicados que abordam a temática e estão nos apêndices:

COSTA, M. S.; GELAPE, G. O.; ANDRADE, A. B.; VAZ-TOSTES, L. P.; SIMÕES, M. S.; OLIVEIRA, R. B.; GUIMARÃES, N. S.; TUPINAMBÁS, U.. COVID-19 reinfection between doses of vaccination: Case Report. *Iniciação Científica CESUMAR*, v. 23, n. 2, p. 185-189, 2021. DOI: 10.17765/2176-9192.2021v23n2e10400

SATO, Hugo Itaru Sato; **COSTA, Murilo Soares**; TAKAHASHI, Ricardo Hiroshi Caldeira; LOURENÇO, Karine Lima; GUIMARÃES, Nathalia Sernizon; ALVES, Claudia Regina Lindgren; MACHADO, Elaine Leandro; TUPINAMBÁS, Unaí; FONSECA, Flávio Guimarães da; TEIXEIRA, Santuza Maria Ribeiro. Description of RT-qPCR in pooled samples (pool testing) for diagnosis of COVID-19. Submetido a revista Einstein.

Além de artigos que foram escritos que serão resubmetidos, sendo que o primeiro consta nos resultados e outro se encontra no apêndice desta tese:

COSTA, Murilo Soares; GUIMARÃES, Nathalia Sernizon; BAHIA, Ana Paula Corrêa Oliveira; VENTURA, Lucas Haniel de Araújo; SATO, Hugo Itaru; ANDRADE, André Barbosa de; VAZ-TOSTES, Luiza Passini; OLIVEIRA, Rhuan Braga; SIMÕES, Madara da Silva; GELAPE, Gabriel de Oliveira; FARIA, Ana Maria Caetano; ALVES, Claudia Regina Lindgren; MACHADO, Elaine Leandro; FONSECA, Flávio Guimarães da; TEIXEIRA, Santuza Maria Ribeiro; TAKAHASHI, Ricardo Hiroshi Caldeira; TUPINAMBÁS, Unai. Investigação do SARS-CoV-2 por meio da RT-PCR em *pool testing* em indivíduos com suspeitos leves ou moderados da COVID-19.

COSTA, Murilo S.; ALVES, Claudia R.L.; FONSECA, Flávio G.; SATO, Hugo I.; ROCHA, Raissa P.; CARVALHO, Alex F.; LOURENÇO, Karine L.; GUIMARÃES, Nathalia S.; MACHADO, Elaine L.; TEIXEIRA, Santuza M.R.; TUPINAMBÁS, Unai; TAKAHASHI, Ricardo H.C.. Face mask use and viral load in patients with mild symptoms of COVID-19

2 INTRODUÇÃO

Um dos marcos históricos do segundo milênio é o surgimento ou reaparecimento de doenças infecciosas e parasitárias (SILVA; 2003). Em uma era com maior avanço na ciência e tecnologia já registrado na humanidade, também relata a falha no controle e combate às moléstias infecciosas.

O impacto da alteração do clima interfere nos seres vivos e contribui com o pensamento da evolução das espécies (OGDEN, GACHON; 2019), em que os seres mais fortes se adaptam e sobrevivem, e desta maneira, o mundo já vivenciou de forma paralela a ocorrência de mutações de agente etiológico já conhecidos (como gonorreia e etc.), superbactérias (provenientes também do uso indiscriminado de antibióticos) (DAVIES, DAVIES; 2010) e sempre há um microrganismo emergente (como por exemplo do gênero *Orthopoxvirus*) ou reemergente (como o ebola, zika, chikungunya, choqueluche, sarampo e outros) causando um alerta sanitário global deixando um sobreaviso tênue para um decreto de uma pandemia (EL-SAYED, KAMEL; 2020).

Mesmo com o avanço da tecnologia, ainda não erradicamos algumas doenças como tuberculose, hanseníase, malária, leishmanioses, sífilis e a transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV), por exemplo e enfrentamos novas doenças.

Entre os agentes etiológicos de importância sanitária está a descoberta do coronavírus que ocorreu em 1965 (TYRRELL, BYNOE; 1965) na Inglaterra. A nomenclatura do vírus ocorreu devido às estruturas externas (os *spikes*) das células serem consideradas parecidas como uma coroa (ALMEIDA, TYRRELL; 1967).

Da identificação do vírus até os dias atuais, a humanidade descobriu que ele tem quatro

subgrupos em sua família: alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ), sendo que a β infecta humanos. Ao longo do tempo já foram registrados casos devidos o coronavírus, em 2002 por meio do *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV), em 2012 por meio do *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) e a partir do final de 2019, iniciado na província de Wuhan na China, apareceram os primeiros casos de uma pneumonia atípica que foram comunicados a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2022)

Ao investigar o agente infeccioso descobriu-se que se tratava de um novo coronavírus, nomeado como *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) causador da *coronavirus disease 2019* ou doença pelo coronavírus 2019, em português, comumente chamada de COVID-19. Em 11 de março de 2020 a OMS decretou a pandemia da COVID-19 (FENG *et al*, 2020; SHEREEN *et al*, 2020; WHO, 2022).

Em dois anos da pandemia da COVID-19 foram relatados mais de 500 milhões de casos identificados e aproximadamente 6,5 milhões de óbitos em todo mundo. No Brasil já foram notificados aproximadamente 40 milhões de casos e aproximadamente 700 mil mortos devido esta moléstia infecciosa (JHU, 2022; WHO, 2022).

A principal forma detecção de novos casos é teste laboratorial, uma ferramenta essencial para o diagnóstico de novas infecções, principalmente em meio a uma pandemia, com isso, o exame padrão-ouro para detecção do SARS-CoV-2 é a *real time reverse transcription polymerase chain reaction* ou a reação em cadeia polimerase de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR), este exame tem um alto preço no mercado (BEECHING; FLETCHER; BEADSWORTH, 2020; YELIN *et al*, 2020), sendo este um fator limitante ao acesso deste exame a toda população, implicando diretamente na vigilância epidemiológica no que se refere a (sub ou não) notificação.

Em contrapartida, uma ideia criada por Robert Dorfman na 2ª Guerra Mundial para investigação de sífilis em soldados é uma estratégia que pode ser aplicada também para os testes que visam a detecção do SARS-CoV-2 por meio da RT-qPCR. Chamada de *pool testing*, também conhecido como *pool*, *pooled*, *pooling*, *group test*, *testing* ou *samples*; cuja ideia é agrupar uma quantidade de amostras e processá-las utilizando um reagente, caso o *pool* seja negativo ou não detectável é considerado que todas as amostras que estão no *pool* sejam não detectáveis/negativas, porém se o *pool* for positivo/detectável é feito a análise de forma individual para descobrir qual ou quais amostras apresentaram o agente etiológico em questão (DORFMAN, 1943).

O número de amostras por *pool* irá variar de acordo com prevalência, quando a prevalência estiver alta, deve-se colocar menos amostras por *pool*, quando estiver baixa pode aumentar o número de amostras por *pool* (DORFMAN, 1943, MALLAPATY, 2020).

Mediante a situação sanitária mundial, levanta-se a problemática sobre como realizar o diagnóstico laboratorial padrão-ouro com menor custo e maior oferta para investigação de novos casos de COVID-19; pressupõe que o *pool testing* pode corroborar na otimização da RT-qPCR e oferecer mais testes para casos sintomáticos e assintomáticos.

O presente estudo, avaliou a utilização do *pool testing* por meio da RT-qPCR como estratégia para detecção do SARS-CoV-2 em casos sintomáticos e assintomáticos, demonstrando a relevância dessa pesquisa devido a ocorrência de casos e mortes, fundamentado em ampliar a oferta do exame padrão-ouro a comunidade, supondo que este método pode contribuir em populações com limitações de recursos financeiros.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DO CORONAVÍRUS

Os coronavírus pertencem a família Coronaviridae inseridos na ordem Nidovirales, subdivididos em quatro subgrupos. A taxonomia dada foi influenciada pelos *spikes*. São formados por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA) e tem o trato respiratório como porta entrada no organismo humano. Seu diâmetro varia entre 65 a 125 nanômetros (nm), apresentando internamente uma proteína de nucleocapsídeo no RNA, sendo que o tamanho pode variar entre 26 a 32 kbs de comprimento (SHEREEN *et al*, 2020).

Este vírus foi descoberto 1965 e inicialmente foi nomeado como vírus respiratório humano B814 (TYRRELL, BYNOE; 1965), as primeiras imagens dele foram publicadas somente 1967, demonstrado na figura 1a (ALMEIDA, TYRRELL; 1967), ao lado está uma imagem (figura 1b) do mesmo vírus publicado pelo *National Institutes of Health* em 2020.

Da descoberta do coronavírus até o início do milênio 2000 não foram relatados casos exacerbados, porém em 2002 a população chinesa da província de Guangdong relatou um aumento dos casos da síndrome respiratória aguda grave proveniente por um coronavírus, pertencente do subgrupo dos β coronavírus e foi nomeado como SARS-CoV. Estes pacientes infectados apresentaram sintomas característicos de uma pneumonia com lesão alveolar difusa, o que levava a uma síndrome do desconforto respiratório agudo (PEIRIS, GUAN, YUEN, 2004; PYRC, BERKHOUT, VAN DER HOEK, 2007). Dados epidemiológicos da época mostram que ocorreram mais de 8.000 infectados e 776 mortes em todo mundo (PEIRIS, GUAN, YUEN, 2004).

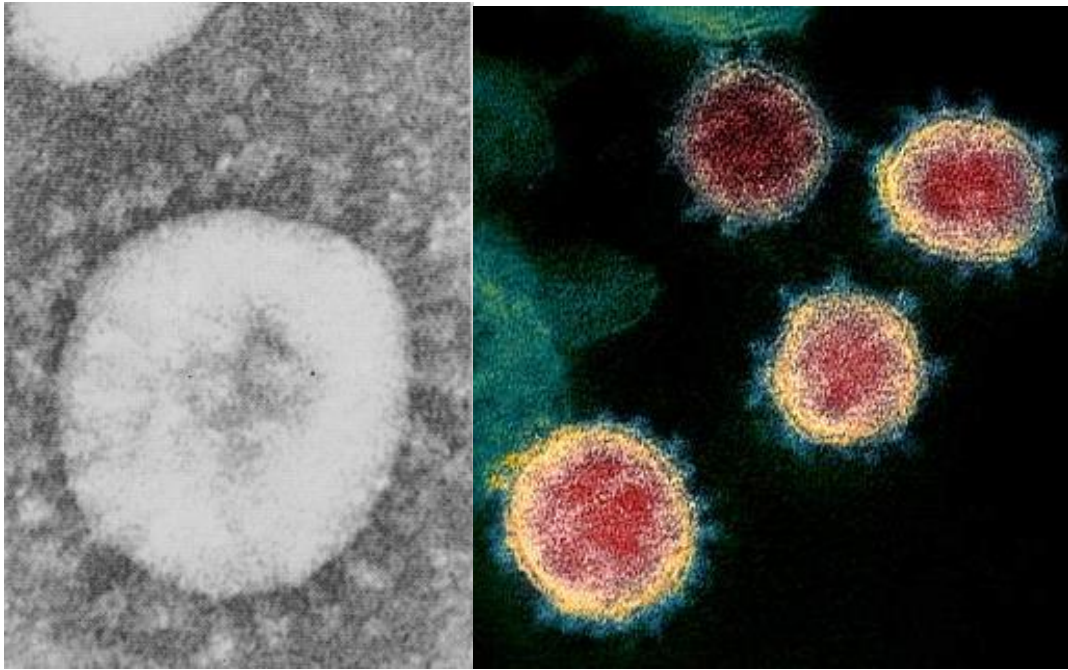


Figura 1 – Imagens do coronavírus por meio de microscopia eletrônica retiradas em tempos diferentes. a) Imagem tirada por June Almeida e publicada no *Journal of General Virology* em 1967. b) Imagem publicada no site *National Institutes of Health* em 2020 (<https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/novel-coronavirus-structure-reveals-targets-vaccines-treatments>).

Após uma década depois da ocorrência do SARS-CoV na China, em 2012 outro coronavírus causou uma epidemia nos países do Oriente Médio, apresentando sinais e sintomas parecidos, este agente patogênico foi nomeado como MERS-CoV (WANG *et al*, 2013). A OMS informou que naquele período ocorreram 2.428 casos e 838 mortes (RAHMAN, SARKAR, 2018).

No final de 2019 o mundo novamente ouviu falar de um coronavírus do subgrupo β , novamente na China, porém desta vez na província de Wuhan. Inicialmente foi relatada como

uma pneumonia de etiologia desconhecida, ligando o surto a pessoas que passaram pelo mercado de frutos do mar e comércio de animais silvestres vivos de Wuhan; após a descoberta do agente etiológico, o vírus foi nomeado pelos pesquisadores chineses como novo coronavírus 2019 (2019-nCoV), porém o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) o nomeou como SARS-CoV-2 e a doença como COVID-19 (CUI, LI, SHI, 2019; LAI *et al*, 2020; WHO, 2020).

O SARS-CoV-2 é envolvido por uma bicamada lipídica com a presença de glicoproteína de envelope (E), proteína de pico ou *spike* (S) e glicoproteína de membrana (M), além de um nucleocapsídeo no seu RNA, como demonstrado na figura 2 (SHEREEN *et al*, 2020).

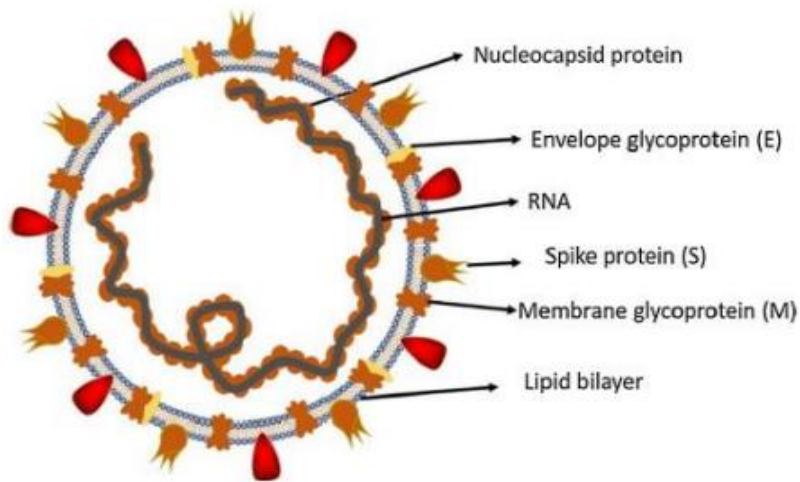


Figura 2 – Estrutura do SARS-CoV-2. Fonte: Shereen *et al*, 2020.

O SARS-CoV-2 apresentou uma maior taxa de transmissão ao comparado com o SARS-CoV. A transmissão ocorre de humano para humano devido o contato próximo com uma pessoa infectada exposta a tosse, espirros, gotículas respiratórias e/ou aerossóis, após serem inalados podem penetrar o corpo humano por meio dos pulmões (SHEREEN *et al*, 2020). Os três vírus

(SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2) apresentam alterações entre si, como mostra figura 3.

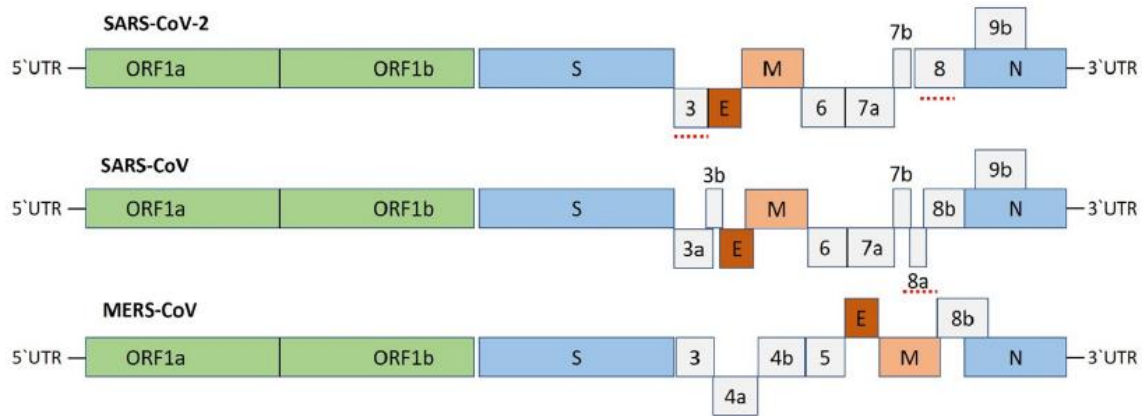


Figura 3 – Organização do genoma dos betacoronavírus; O genoma do Betacoronavírus para humanos (SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV) compreende a região 5' não traduzida (5' - UTR), quadro de leitura aberto (ORF) 1a/b (ORF1a/ORF1b) que codifica não estrutural proteínas (NSP) para replicação, proteínas estruturais, incluindo *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), proteínas acessórias (ORF 3, 6, 7a, 7b, 8, 9b e demais) no genoma do SARS-CoV-2 e na região 3' - não traduzida (3' -UTR). O pontilhado sublinhado em vermelho é a proteína que mostra a principal variação entre SARS-CoV-2 e SARS-CoV. O comprimento de nsps e orfs não são desenhados em escala. Fonte: Shereen *et al*, 2020.

O SARS-CoV-2 tem genes específicos na região ORF1 que codificam proteínas para replicação viral, nucleocapsídeo e formação dos *spikes*, este último que é responsável de fazer a fixação e entrada do vírus nas células pulmonares. A ligação do domínio de ligação ao receptor (RBD) viabiliza o vírus infectar vários hospedeiros. Em relação aos seres humanos, os coronavírus entram no organismo por meio dos pulmões, através dos pneumócitos tipo 2, ligando na enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), dentro da célula ocorre a replicação e excitação do vírus, podendo desta maneira, atingir diversos órgãos e ocasionar diferentes sinais e sintomas (SHEREEN *et al*, 2020).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DA COVID-19

Em dois anos da pandemia da COVID-19 foram relatados mais de 630 milhões de casos identificados e aproximadamente 6,5 milhões de óbitos em todo mundo. No Brasil já foram notificados aproximadamente 40 milhões de casos e aproximadamente 700 mil mortos devido esta moléstia infecciosa (JHU, 2022; WHO, 2022). As figuras a seguir mostram a posição do Brasil em número de casos e óbitos em relação ao mundo (figura 4 e 5) e a série histórica de casos e óbitos (figura 6 e 7).

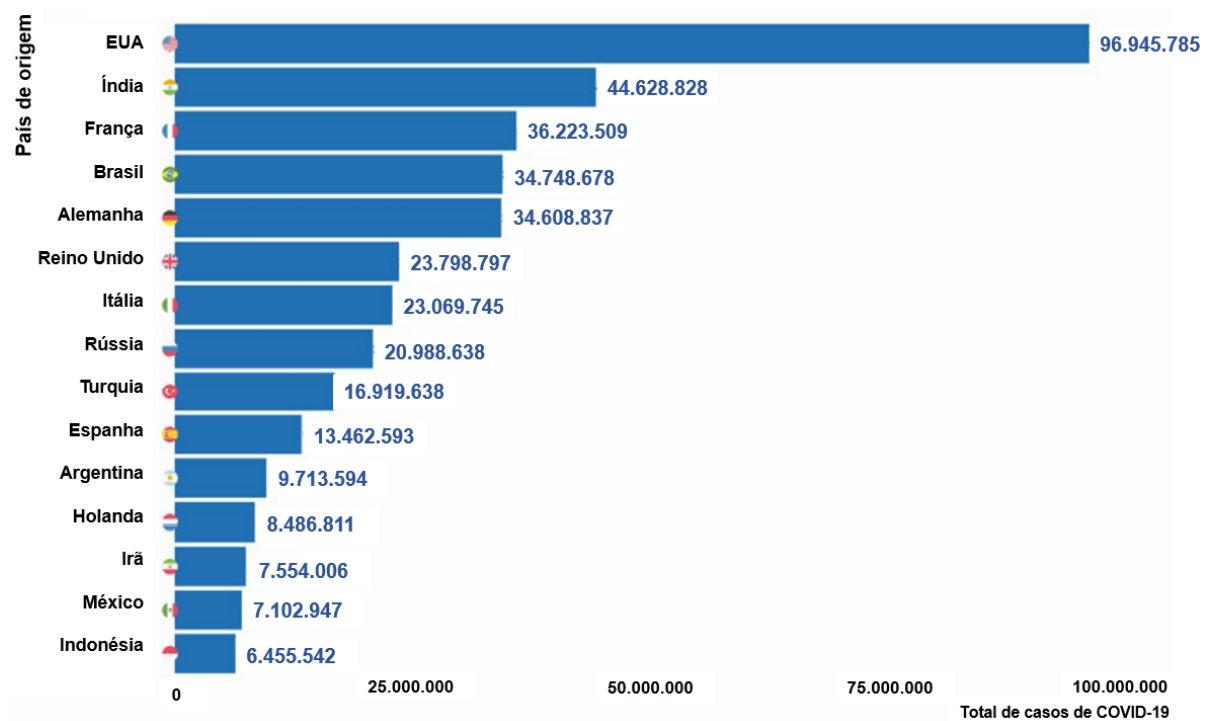


Figura 4- Distribuição do total de casos de covid-19 entre os 15 países com maior número de casos até 15/10/2022.

Fonte: Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, 2022.

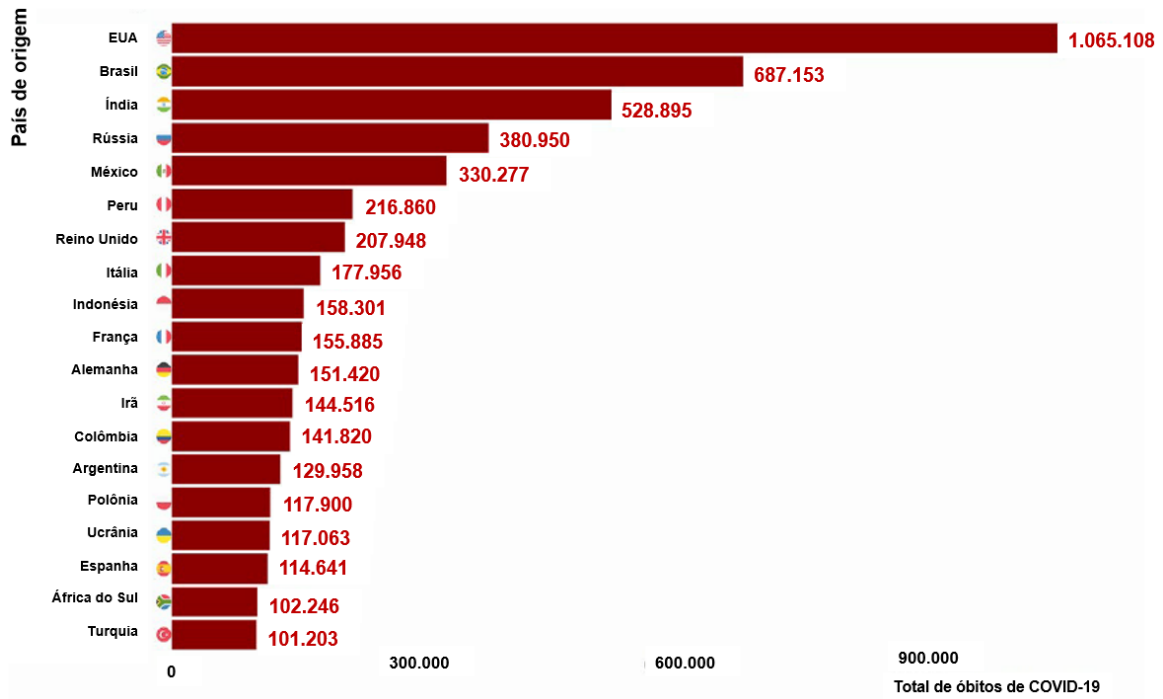


Figura 5- Distribuição do total de casos óbitos de covid-19 entre os 19 países com maior número de casos até 15/10/2022. Fonte: Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, 2022.

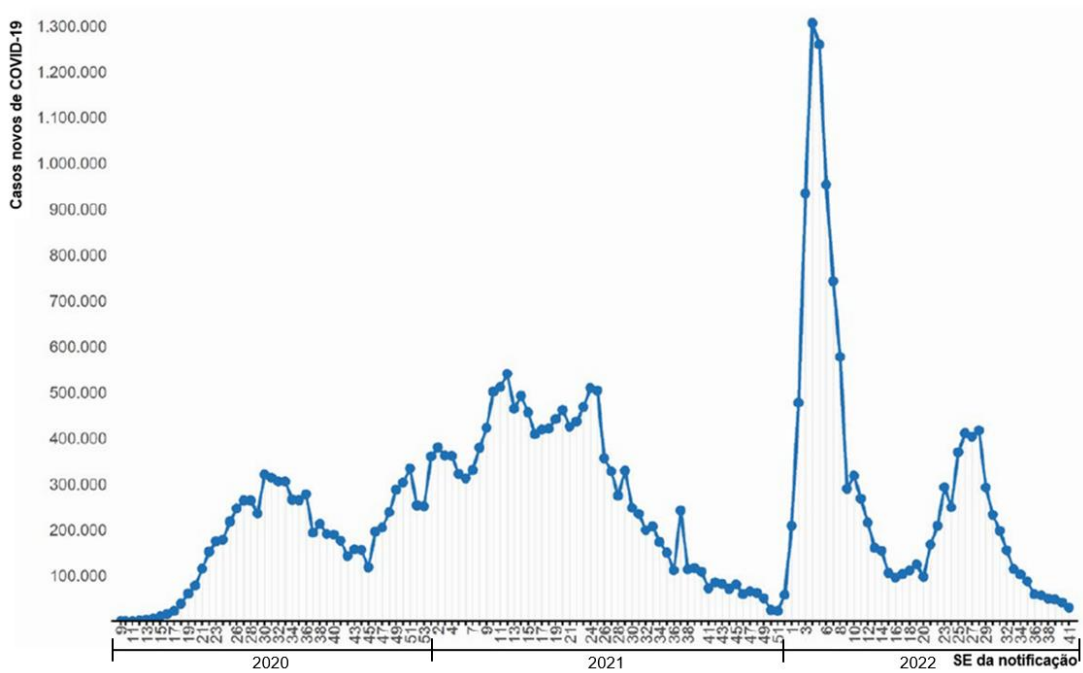


Figura 6 - Distribuição dos novos registros de casos por covid-19 por semana epidemiológica de notificação até 15/10/2022, Brasil, 2020-22. Fonte: Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, 2022.

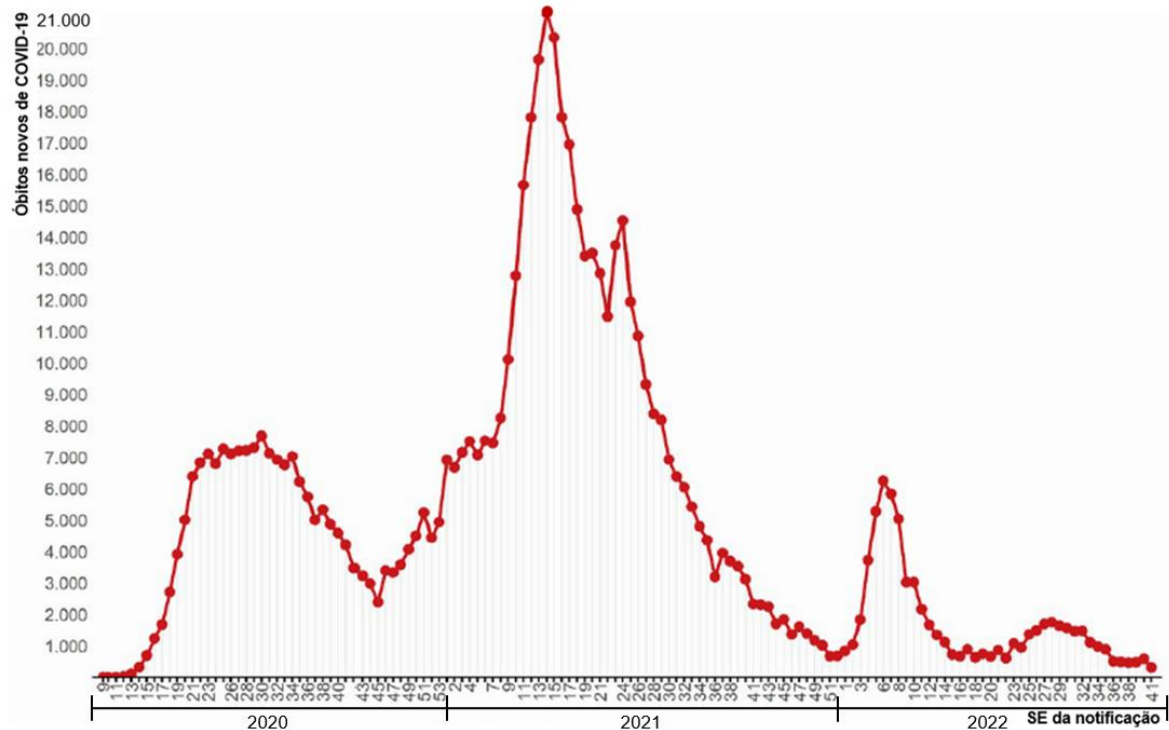


Figura 7 - Distribuição dos novos registros de óbitos por covid-19 por SE de notificação até 15/10/2022, Brasil, 2020-22. Fonte: Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde, 2022.

Uma revisão sistemática mostrou o espectro dos sinais e sintomas da COVID-19 e a sensibilidade e especificidade de cada um (STRUYF *et al*, 2020). Outra revisão sistemática descreveu os sinais e sintomas mais comuns até julho de 2020, sendo febre (76,70%), tosse (67,76%), diminuição do olfato (40,80%) e paladar (34,52%), dispneia (37,49%), fadiga (29,93%), produção de escarro (17,85%), dor de garganta (16,17%) e dor de cabeça (15,49%) (XIE *et al*, 2020).

O conhecimento sobre os sinais e sintomas da COVID-19 independente das variantes ou subvariantes do SARS-CoV-2 podem corroborar para solicitação de testes diagnósticos para confirmação da COVID-19 ou refuta para iniciar a busca por um diagnóstico diferencial.

3.3 TESTES DIAGNÓSTICOS

O conhecimento sobre o vírus, em suas diversas facetas, como: estrutura, modo de transmissão, excreção, tempo de resistência sobre a superfície (KAMPF *et al*, 2020), sequência do RNA (KIM *et al*, 2020) e outras informações são necessárias para realização de diferentes formas de diagnóstico.

Com a rápida disseminação do SARS-CoV-2 pelo mundo (LI *et al*, 2020) e no Brasil (CANDIDO *et al*, 2020), além da continuidade da ocorrência de outras doenças infecciosas, faz-se necessário o correto diagnóstico diferencial para vigilância adequada após o resultado.

Desta maneira, foram utilizados diferentes métodos diagnósticos para o SARS-CoV-2, como: RT-qPCR, teste quantitativo de anticorpos IgM e IgG, teste rápido imunocromatográfico de sangue ou de secreção nasal, teste rápido de antígeno, teste utilizando a saliva ou material fecal, utilização de radiografia/tomografia do tórax e o diagnóstico clínico (KEVADIYA *et al*, 2021).

A RT-qPCR é considerada o exame padrão-ouro, como concluído uma meta-análise (KHATAMI *et al*, 2020), os autores ainda sugerem que todas pessoas sintomáticas deveriam realizar a RT-qPCR. A sensibilidade e especificidade desse exame podem ser alteradas de acordo com o local que foi extraído o RNA, sendo de 96,6% e 100% para Nucleocapsídeos, 96% e 100% para ORF1ab e 95,7% para gene da polimerase de RNA dependente da RNA (RdRp) (MOLLAEI *et al*, 2020; VOGELS *et al*, 2020).

As amostras mais estudadas para realização do exame padrão-ouro por meio da extração do RNA foram: coleta de *swab* da nasofaringe, aspiração de secreção da nasofaringe, *swab* da orofaringe, escarro, fezes (KHATAMI *et al*, 2020) sangue, saliva e urina (BÖGER *et al*, 2020).

Com isso, pesquisadores realizaram uma revisão sistemática e meta-análise (BÖGER *et al*, 2020) sobre este assunto e demonstraram que o material que apresentou menor sensibilidade foi a urina (0,0% intervalo de confiança -IC: 95% 0,0%-3,7%), já o escarro teve o melhor desempenho encontrado, com 97,2% na sensibilidade, variando o IC 90,3% a 99,7%. A coleta aparentemente mais utilizada nestes estudos foi a de *swab* ou aspiração de secreção da nasofaringe, que apresentou a sensibilidade de 73,3% (IC 95% 68,1%-78,0%).

Mediante um alerta sanitário global, a pandemia da COVID-19 demonstrou a importância da realização de exames na população, para detecção de novos casos no momento oportuno e/ou precoce, realizando o isolamento social para evitar a disseminação; Liang e colaboradores (2020) relatam que a mortalidade da COVID-19 está associada ao menor número de testes, bem como a menor eficácia dos governos para sanar este e outros pontos básicos, como melhorar a infraestrutura.

Além disso, a pandemia da COVID-19 mostrou que se faz necessário ter mais e o melhor teste disponível para população, para que se possa ser testado as pessoas antes de terem sinais e sintomas, porém que tiveram contatos com casos positivos confirmados (MANABE; SHARFSTEIN; ARMSTRONG, 2020). Com isso, o *pool testing* pode ser aplicado para monitorar comunidades para vigilância epidemiológica de forma eficaz (BRAULT; MALLEIN; RUPPRECHT, 2021).

3.3.1 *Pool testing*

Uma proposta para aumentar a testagem em larga escala da população defendida por alguns autores pode ser o *pool testing*, uma estratégia para compreender melhor o cenário epidemiológico da pandemia e desta maneira corroborar para criação de políticas públicas voltadas para proteção e recuperação a saúde (BEN-AMI *et al*, 2020; REILLY, CHOCHAN, 2021; ŽILINSKAS, LANČINSKAS, GUARRACINO, 2021).

Este é um método desenvolvido por Robert Dorfman durante a 2ª Guerra Mundial, que visa o agrupamento de amostras para realização dos exames utilizando um reagente como se fosse para uma amostra, naquela ocasião ele visou rastrear casos positivos para *Treponema pallidum*, o agente etiológico causador da sífilis, e o seu público investigado eram os soldados (DORFMAN, 1943).

Na atualidade o método *pool testing* é utilizado em alguns bancos de sangue no mundo para detecção de infecções, em especial pelo vírus HIV (McMAHON, *et al*, 1995) ou para monitorar o tratamento do HIV-1 em locais com recursos limitados (BOOBALAN, DINESHA, GOMATHI, 2019).

No contexto da COVID-19 o *pool testing* foi utilizado em diferentes estratégias, como *pool* de saliva (BARAT *et al*, 2021; KÄSTNER *et al*, 2022), de testes rápidos (SALCEDO, HARMON e HERRERA, 2021) e para RT-qPCR (COSTA *et al*, 2021). No caso da realização do *pool testing* por meio da RT-qPCR para detecção do SARS-CoV-2, uma revisão mostrou que a sensibilidade variou entre 60% a 100% e a especificidade de 95% a 100% (COSTA *et al*, 2021).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o método *pool testing* na RT-qPCR para investigação do SARS-CoV-2 em pacientes com síndrome gripal atendidos na Unidade de Pronto Atendimento (UPA) Centro Sul e em alunos do curso de medicina assintomáticos do 9º ao 12º semestre da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) ambos em Belo Horizonte, Minas Gerais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Discorrer sobre a utilização do método *pool testing* na RT-qPCR para rastreamento do SARS-CoV-2 por meio de uma revisão integrativa;
- Testar o método em pessoas sintomáticas atendidas na UPA Centro-Sul por meio do *pool testing* na RT-qPCR para detecção do SARS-CoV-2;
- Analisar a viabilidade da autocoleta e do *pool testing* em acadêmicos de medicina da UFMG assintomáticos como forma de rastreamento do SARS-CoV-2 antes das práticas clínicas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa “avaliação do diagnóstico da COVID-19 em pacientes com síndromes gripais atendidos nos centros especializados de COVID-19 em Belo Horizonte e do acompanhado por telemonitoramento” foi aprovada pelo Comitê de Ética da UFMG, CAAE-35074720.3.0000.5149, 23 de junho de 2020.

5.2 DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, realizado no Centro Especializado em COVID-19 (CECOVID) pertencente à UPA Centro-Sul do município de Belo Horizonte durante o período de 10 setembro de 2020 a 19 março de 2021 com pessoas sintomáticas que foram atendidas. Houve também a autocoleta por acadêmicos de Medicina da UFMG que estavam entre o 9^a ao 12^o semestre para investigação da infecção do SARS-CoV-2 em fevereiro de 2021, ambos participantes da pesquisa tiveram seus exames processados por meio do *pool testing*.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os pacientes que foram examinados previamente pela equipe do CECOVID na UPA que apresentaram sintomas leves ou moderados compatíveis com a suspeita da COVID-19, sendo considerado leves aqueles que apresentaram poucos sinais e sintomas, e moderados

aqueles que apresentaram diversos sinais e sintomas, incluindo dispnéia, porém sem a necessidade do uso de máscara de oxigênio.

Maiores de 18 anos, que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), no qual declararam a sua concordância em participar da pesquisa.

Pessoas acima de 60 anos que tenham algum problema cognitivo e que estejam acompanhadas por algum responsável para responder o questionário.

Ser acadêmico do 9º ao 12º período do curso de Medicina da UFMG.

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não foram incluídos na testagem os pacientes em cuja avaliação clínica foi descartada a infecção pela COVID-19, bem como os pacientes que apresentaram alguma condição que sugira a contraindicação da coleta de material, a critério do médico que fez o atendimento.

Foram excluídos aqueles que tiveram perdas de amostras biológicas e/ou dados incompletos.

Casos que já tinham diagnóstico confirmado.

Casos graves (pessoas que necessitavam de máscara de oxigênio e internados).

5.5 AMOSTRAGEM

As amostras foram por conveniência, haja visto que a população estava acessível tanto na UPA Centro-Sul como os acadêmicos de medicina da UFMG.

5.6 COLETA DE DADOS

Seguindo os protocolos e fluxogramas do Ministério da Saúde (2020), de 13 de outubro de 2020 a 19 de março de 2021 ocorreu a coleta de dados da pesquisa após os atendimentos médicos e detecção precoce da COVID-19 na UPA 24 horas, visando atender indivíduos com sintomas leves e moderados que apresentaram febre e/ou sintomas respiratórios (tosse, secreção nasal, dificuldade respiratória); foi fornecida uma máscara à pessoa que não tinha e depois era realizada a classificação de risco para a consulta médica.

Na sequência, os pacientes foram convidados para participar da pesquisa, era explicado seus objetivos e por seguinte apresentado o TCLE, em caso de aceitação era recolhido a assinatura no TCLE e deixado uma via com o participante, em seguida era aplicado o questionário (APÊNDICE B).

Posteriormente era coletado a amostra biológica com o *swab* a ser inserido na nasofaringe por um profissional devidamente paramentado (avental, máscara N95/PPF2 ou equivalente, óculos e/ou proteção facial, gorro e luvas), eram coletadas duas amostras, uma para cada narina, inserindo-o entre aproximadamente a distância entre as narinas e a abertura externa da orelha, depois fazer uma rotação de 360°. Ressalta-se que o material do *swab* foi de “fibra sintética com haste de plástico” seguindo a recomendação Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (2020). Após a coleta foi imergido o *swab* em tubo estéril contendo 2 a 3 ml de meio de transporte viral.

Após a realização da coleta os *swabs* eram desprezados no lixo infectante, os materiais biológicos contidos nesse lixo eram incinerados, a destinação desses resíduos biológicos era de responsabilidade da UPA Centro-Sul, conforme rotina operacional.

As amostras eram duplamente etiquetadas, uma etiqueta era com nome completo, sendo a mesma utilizada na admissão do paciente na UPA Centro-Sul e a outra etiqueta constava o código da pesquisa, onde era anotado em uma planilha as mesmas informações, além de números de telefone e data; uma cópia dela era encaminhado para o laboratório.

Estas amostras foram conservadas entre 4° a 8°C em uma geladeira com um termômetro digital na UPA Centro-Sul e encaminhadas para o laboratório em uma caixa térmica com placas de gelo reutilizável que foram posteriormente limpas e desinfetadas, seguindo protocolo estipulado (RIO DE JANEIRO, 2020). O material coletado era encaminhado ao laboratório do Centro de Tecnologia de Vacinas (CT-Vacinas) da UFMG por meio de um veículo da Prefeitura de Belo Horizonte.

Os questionários foram tabulados em uma planilha e foi gerado um banco de dados, já os resultados laboratoriais foram inseridos em outra planilha, um segundo banco de dados. Ambos os bancos tiveram 20% dos resultados auditados de forma aleatória, foi utilizado um site de sorteio de números para conferência das informações, as discrepâncias foram sanadas. Os resultados da RT-qPCR foram enviados para os participantes via WhatsApp®.

Para os acadêmicos de Medicina da UFMG foi enviado um e-mail com convite para participarem da pesquisa, além do TCLE e o questionário online, foi utilizado a autocoleta como método para adquirir o material biológico, as amostras foram também duplamente etiquetadas, armazenadas em um recipiente refrigerado e encaminhado para o CT-Vacinas; os resultados foram enviados via WhatsApp®.

5.7 DESCRIÇÃO DO *POOL TESTING*

O procedimento de coleta dos *swabs* nasofaríngeos de casos suspeitos de infecção pelo SARS-CoV-2 foi realizado por profissionais paramentados, treinados e materiais estéreis para coleta. Em seguida, o *swab* de cada paciente foi imerso em tubo contendo 1 mL de solução de inativação e transporte viral (CARVALHO *et al*, 2021) e o mesmo prosseguiu para processamento e análise no laboratório dentro de 18 horas.

Dentro de uma estrutura de laboratório com nível de biossegurança 2, um técnico previamente treinado efetuou a preparação dos *pools* para realização da RT-qPCR, que consistiu na adição de 50 microlitros de cada amostra em microtubos de 1,5 mL. O restante da amostra foi estocado adequadamente para posterior análise ou não, dependendo do resultado do teste em *pool*. O número de amostras por *pool* foi determinado pela estimativa da prevalência da COVID-19 na população em estudo, variando de 3 a 16 amostras por *pool*. Após homogeneização, o processo de extração de RNA e RT-qPCR ocorre normalmente, como se fosse realizado em somente uma única amostra, levando em conta que o volume máximo de amostra a ser processada utilizando uma coluna de extração de RNA é de 140 microlitros.

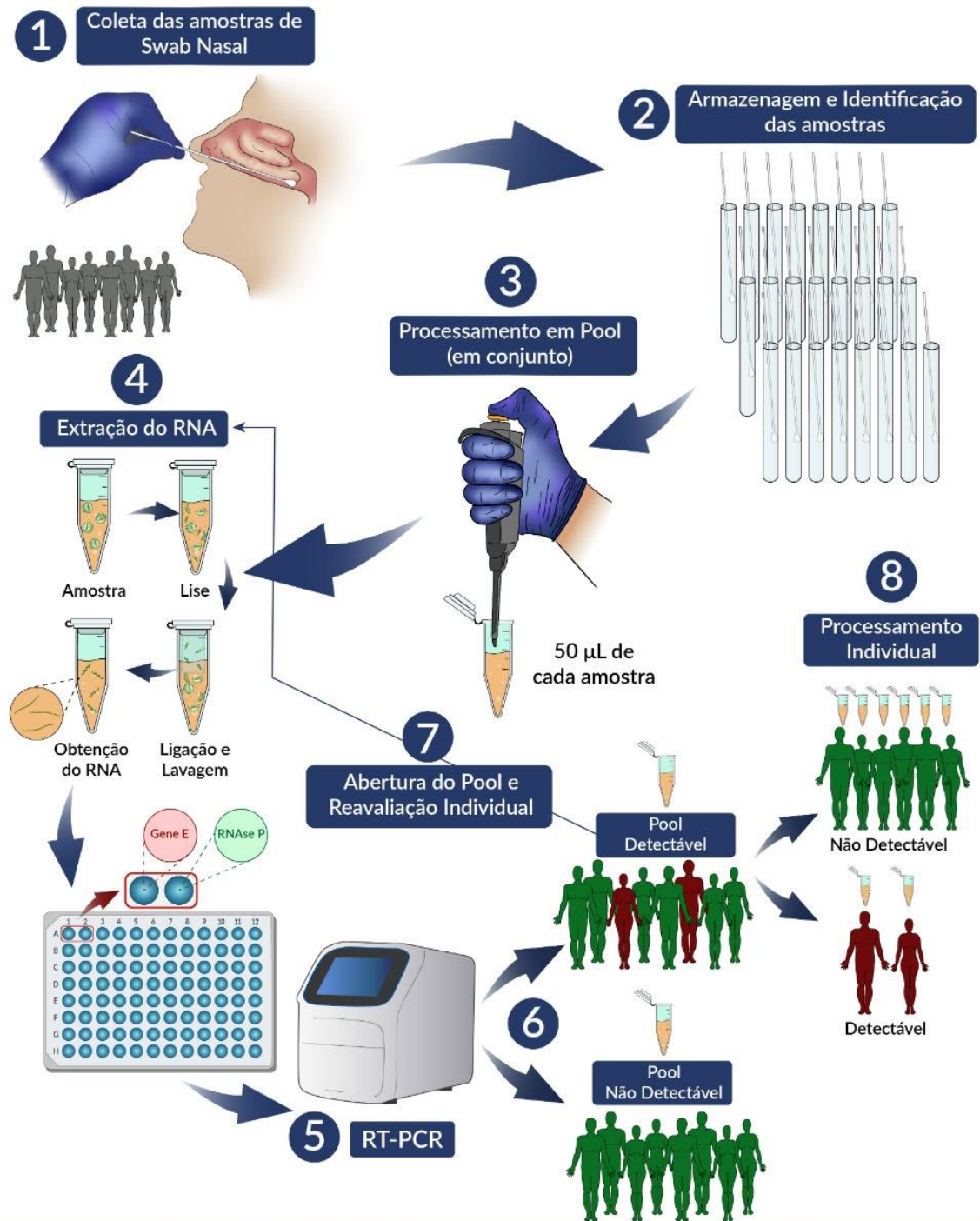
Para extração e purificação do RNA utilizou-se o protocolo descrito no kit “*QIAamp Viral RNA Mini Kit*” da empresa QIAGEN (Alemanha). Após a síntese do ácido desoxirribunocleico complementar (cDNA), as PCRs foram realizadas com uma sonda para o gene endógeno da RNase P humana e o gene (E) que codifica o envelope viral, utilizando o termociclador em tempo real QuantStudio 5, seguindo o protocolo de Charité para quantificação (CORMAN *et al*, 2021).

Nos casos em que o resultado do *pool* era detectável para RNA viral, realizou-se processamento individual das amostras presentes naquele agrupamento, utilizando 140 microlitros para extração do RNA de cada amostra. Quando o resultado do *pool* foi não detectável, interpretou-se da seguinte forma: todas as amostras presentes no agrupamento consideradas como tendo resultado não-detectável para RNA viral e, dessa forma, não foi necessário testá-las de modo individual como apresentado pela Figura 8.

Em agrupamentos com resultados inconclusivos devido à ausência de amplificação do gene endógeno era necessário a remontagem do *pool*. Para resultados com uma pequena quantidade de RNA viral inicial, ficando com valores de C_t próximos ao limiar de detecção do método (o limite de detecção ou ponto de corte ou *cut-off* podem oscilar de acordo com os kits de insumos utilizados em cada laboratório, devido a diferenças como a eficiência enzimática, o rendimento e qualidade do RNA extraído) realizou-se o processamento individual daquelas amostras que compuseram o determinado *pool*.

Os pontos de corte dos testes foram definidos como determinado anteriormente (COSTA *et al*, 2021), estabelecendo o limite de 32 amostras por *pool*, sendo que este é o limite garantido a sensibilidade e especificidade. Após análise dos resultados, as amostras que foram autorizadas foram estocadas a -80°C na solução de inativação e transporte. As amostras de RNA purificado foram também estocadas em ultrafreezers a -80°C .

A obtenção e liberação dos resultados foi realizada em no máximo 72h após a chegada das amostras ao laboratório. A Figura 8 apresenta a estratégia de realização da RT-qPCR em *pool testing*.



Para abertura do pool e reavaliação individual é necessário que as etapas 4 (extração e purificação do RNA) e 5 (amplificação e detecção por RT-PCR) sejam realizadas para cada amostra, as quais compuseram aquele determinado pool detectável, retornando um resultado individual (etapa 8) e possibilitando a distinção das amostras detectáveis e não detectáveis.

Figura 8 – Estratégia de realização da RT-qPCR em *pool testing*. Fonte: Autor

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis presentes estudadas foram: *pool* detectáveis, resultado individual, idade, sexo, etnia, e informações relacionadas a saúde do paciente (sintomas e comorbidades).

Em todas as etapas descritas a seguir foram necessárias a utilização do software R. Primeiramente, foi feita a limpeza e adequação dos dados coletados pela pesquisa, isso envolveu a checagem manual de cada variável para avaliar se havia incongruências. Todas as incongruências encontradas foram corrigidas, onde a correção não foi possível os dados foram descartados.

Foram utilizados recursos gráficos para a análise do perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes, bem como para a análise da proporção e distribuição de pacientes detectáveis para SARS-CoV-2.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1 - Detection of SARS-CoV-2 through pool testing for COVID-19: an integrative review

Murilo Soares Costa¹, Nathalia Sernizon Guimarães¹, André Barbosa de Andrade², Luiza Passini Vaz-Tostes², Rhuan Braga Oliveira², Madara da Silva Simões², Gabriel de Oliveira Gelape², Claudia Regina Lindgren Alves³, Elaine Leandro Machado⁴, Flávio Guimarães da Fonseca⁵, Santuza Maria Ribeiro Teixeira⁵, Hugo Itaru Sato⁵, Ricardo Hiroshi Caldeira Takahashi⁶ and Unaí Tupinambás^{1,7}

1. Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Belo Horizonte, MG, Brasil.

2. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, MG, Brasil.

3. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Pediatria, Belo Horizonte, MG, Brasil.

4. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Medicina Preventiva e Social, Belo Horizonte, MG, Brasil.

5. Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Tecnologia de Vacinas, Belo Horizonte, MG, Brasil.

6. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Matemática, Belo Horizonte, MG, Brasil.

7. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Clínica Médica, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Abstract

Introduction: The pool testing technique optimizes the number of tests performed and reduces the delivery time of results, which is an interesting strategy for the health crisis caused by the COVID-19 pandemic. This integrative review investigated studies in which pool testing was carried out for epidemiological or screening purposes to analyze its clinical or cost effectiveness and assessed the applicability of this method in high-, middle-, and low-income countries.

Methods: This integrative review used primary studies published in the MEDLINE, EMBASE, *Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS)*, and Cochrane Library databases. **Results:** A total of 435 studies were identified: 35.3% were carried out in Asia, 29.4% in Europe, 29.4% in North America, and 5.9% in Oceania. **Conclusions:** This review suggests that pool testing in the general population may be a useful surveillance strategy to detect new variants of SARS-CoV-2 and to evaluate the period of immunogenicity and global immunity from vaccines.

Keywords: COVID-19. SARS-CoV-2. Pool testing. Diagnosis. Pandemic.

INTRODUCTION

As of the beginning of 2021, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has been responsible for more than 3.5 million deaths and 165 million cases worldwide. These numbers placed the disease caused by SARS-CoV-2, coronavirus disease 2019 (COVID-19), as the most critical public health crisis in the last 100 years¹. Approximately 80% of

infections are mild or asymptomatic cases, although these individuals are still contagious and contribute to viral transmission². When the disease occurs without severe symptoms, people are less likely to recognize it and are therefore less likely to seek medical help, thus impairing prompt diagnosis, contact screening, and disease control. Symptomatic infections, as well as a substantial number of mild or asymptomatic infections, may go undetected in some countries. Moreover, confirmed case counts are biased owing to incomplete testing and low test sensitivity. Accurate estimates of the burden of SARS-CoV-2 infections are critical for understanding the course of the pandemic and informing the public health response³.

To understand the real epidemiological profile, incidence rate, prevalence, virulence, and lethality of the virus, it is necessary to test as many people as possible⁴. Cases are classified as asymptomatic⁵, symptomatic respiratory, flu-like syndrome, or severe acute respiratory syndrome⁶, based on clinical assessments complemented by laboratory tests.

Tests to detect viral antigens, such as immunochromatography and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), are currently used to detect infected individuals. Nevertheless, real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect viral ribonucleic acid (RNA) continues to be the most widely used diagnostic test and is the gold standard for confirming COVID-19. Tests to detect viral antigens or RNA rely on nasopharyngeal swabs or, in some cases, on bronchiolar secretions. These are usually collected in viral transport media and immediately forwarded to a diagnostic laboratory⁷.

Considering the importance of increasing the number of tests to detect SARS-CoV-2 in the population, a suitable alternative is to perform RT-PCR, which uses the pool testing strategy developed by Dorfman^{8,9}. Pool testing is a method of grouping several samples to be analyzed

together. A second test on individual samples must be performed if a positive sample is present in the pool. If no positive result is detected in the pool, all samples are considered non-detectable^{10,11}. The number of samples per pool can vary according to the prevalence of infection (**Supplementary Table 1**)¹²⁻¹⁴.

Pool testing is currently a suitable strategy for coping with the COVID-19 pandemic. More than ever, it is necessary to expand access to COVID-19 diagnostic tests and to identify presymptomatic and asymptomatic individuals who contribute silently to the fast dissemination and maintenance of the pandemic¹⁵. Increased testing has also become essential as a tool to reduce the rapid dissemination of the virus and an increase in mutant variants, which are a growing threat worldwide¹⁶. This method can reduce the costs for health systems and increase testing scalability. It is known that the countries that were best able to control the pandemic were those that carried out mass tests in their populations. Therefore, pool testing has become an alternative method for mass testing. Pooling samples enables a rapid increase in screening capacity, which is essential to inform public health actions and to control the spread of COVID-19¹⁷.

Given the current importance of this topic, this study sought to review research that applied pool testing as a diagnostic method for SARS-CoV-2 in order to investigate the scenarios in which these investigations were carried out (epidemiological or screening, clinical analysis or cost-effectiveness analysis) and the applicability of this method in high-, middle-, and low-income countries.

METHODS

Search databases

This integrative review is based on primary studies published between March 1, 2020 and January 24, 2021 in the Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE), *Excerpta Medica* database (EMBASE), *Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde* (LILACS), and Cochrane Library databases, as well as a search conducted for gray-literature articles through a manual search for references of selected articles or through Google Scholar (active search for local articles in references of found studies, sites, pre-prints, or conference annals). The search was not limited by the language of publication or by studies from high-, middle-, or low-income countries. To identify the references, a sensitive search was conducted.

This study included studies whose outcome variables were determined by the diagnoses reached using the pooling test. Variables of interest were the pooling test, comparisons between the pooling test and RT-PCR, and positivity profiles measured by direct methods. Observational (cross-sectional, case-control, cohort, and case studies), interventional (randomized controlled trials), or cost-effectiveness studies were included. Systematic reviews, meta-analyses, narrative reviews, and integrative reviews were excluded.

Screening criteria

Titles and abstracts of studies retrieved using the search strategy and those from additional sources were screened separately by two authors to identify studies that potentially met the inclusion criteria outlined above. The full texts of these potentially eligible studies were retrieved and independently assessed for eligibility by two review authors. Disagreements between reviewers on the eligibility of the studies were resolved through discussion with a third

review author.

Data extraction

Two authors evaluated articles retrieved independently during eligibility searches using Mendeley Reference Manager (Mendeley, London, United Kingdom). Data extraction was performed using a standardized and pre-tested form for Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA) to build an evidence-tuning worksheet.

The variables extracted from the articles were authors' names, affiliations, journals, countries of the studies, population, number of pools performed, number of samples per pool, number of detectable pools, percentage of detectable pools, percentage of individual detection within the detectable pools, type of information about the study/article, study category, and disclosure.

RESULTS

This study identified 425 articles from databases and 10 in the gray literature by a manual search for references of selected articles and through Google Scholar. Of the studies related to searching indexed databases, 367 studies were excluded by reading the titles and abstracts, leaving 58 studies for a full evaluation. During the evaluation of the texts, 12 studies were excluded because they did not apply pool testing to the studied population, 7 were excluded as pre-prints, and 22 were excluded for expressing an opinion on the subject without presenting numerical data. Thus, 17 studies were part of our sample, with 7 articles derived from the databases and 10 studies obtained from the gray literature. An overview of the selection process is presented in **Figure 9**.

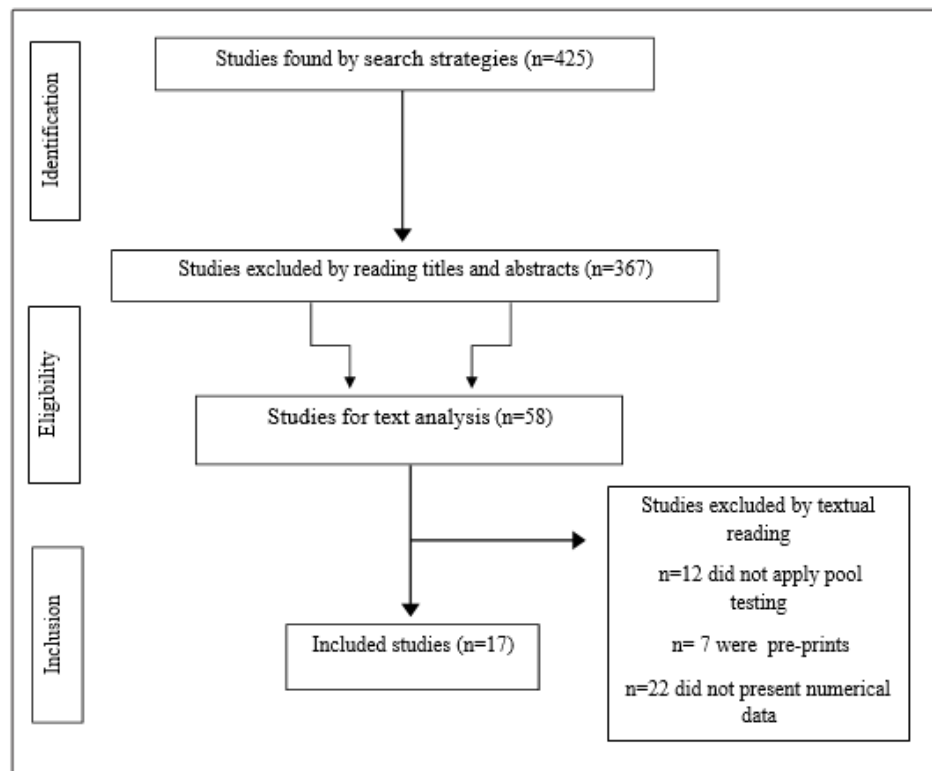


FIGURE 9: Study eligibility flowchart

Characteristics of studies

Table 1 summarizes the characteristics of the 17 individual studies published in 2020 (94.1%) and 2021 (5.9%) included in this integrative review. Of the studies included, 35.3% (n=6) were carried out in Asia, 29.4% (n=5) in Europe, 29.4% (n=5) in North America, and 5.9% (n=1) in Oceania (**Table 1**).

The articles were published in journals with impact factors ranging from 1.705 (24) to 21.770 (26), with 70.6% (n=12) presented in journals with an impact factor greater than 2.000. In terms of study format, 41.2% (n=7) of the studies were original articles, 23.5% (n=4) were brief reports, 23.5% (n=4) were letters, 5.9% (n=1) were opinions, and 5.9% (n=1) were special

articles. Pool testing was evaluated using cross-sectional studies (diagnostic accuracy) in 82.3% (n=14) of studies, as a case-control study in 11.8% (n=2) of studies, and as a case report in 5.9% (n=1) of studies. Regarding the institutions in which the studies were conducted, 76.4% (n=13) were carried out in universities, 17.4% (n=3) in research institutes, and 5.9% (n=1) in hospitals (**Table 1**).

Regarding the evaluated population, 29.4% (n=5) of studies evaluated samples taken from the general population, 23.5% (n=4) from health professionals, 23.5% (n=4) from asymptomatic patients, 11.8% (n=2) from patients with mild symptoms, and 11.8% (n=2) from hospitalized patients (**Table 1**). The 17 studies in this review were published between 2020 and 2021 in heterogeneous populations in 8 countries. The number of individual samples per pool ranged from 2 to 50 (number of samples per pool) with between 1 and 7,175 pool tests. The total number of individual samples in this review was 217,348, with between 10 and 59,476 samples per study. The positive pools and positive samples showed varied results, as shown in **Table 2**.

DISCUSSION

The objective of this review was to identify studies that applied the pool test as a diagnostic method for SARS-CoV-2 and to describe the research scenarios. We found studies from four different continents. Although RT-PCR is considered the gold standard for the diagnosis of COVID-19, it is an expensive test when performed individually, which can have an impact on a country's capacity to offer this test to the general population when following the epidemiology and/or natural history of the disease. Thus, due to the limited availability of test kits and their high cost, wider testing using the PCR method presents a challenge in coping with COVID-

19³⁴. In this scenario, the pooled sample test (considered effective in screening for human immunodeficiency virus, chlamydia, malaria, and influenza) can be considered an important strategy to increase screening capacity and speed up tests for COVID-19³⁵.

Most of these studies were cross-sectional studies carried out by universities and aimed to establish ideal parameters for the combined group test for the detection of SARS-CoV-2, as well as to verify the feasibility of sample pooling as a strategy to increase test performance. Universities around the world play a crucial role in the development of new and more efficient technologies to assist in the diagnosis of COVID-19, either to develop strategies that optimize resources in this period of reagent shortage or to propose new, safer, and more cost-effective protocols, as shown by Schmidt et al.³⁰. Of the studies evaluated in this review, only four were not conducted directly by universities, which highlights the importance of academic institutions for the development and optimization of techniques and the rational use of reagents.

TABLE 1: Characteristics of the studies included in the integrative review regarding COVID-19 diagnostics.

Reference	Institute	Journal	Country	Population	Study category	Type of information
Abdalhamid et al. (18)	University of Nebraska	AJCP	USA	People at risk for COVID-19	Special article	Cross-sectional: Screening
Ben-Ami et al. (19)	The Hebrew University of Jerusalem	Clinical Microbiology and Infection	Israel	Asymptomatic	Original article	Cross-sectional: Screening
Chong et al. (20)	Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory; University of Melbourne	Pathology	Australia	Hospital inpatients, healthcare workers	Brief report	Cross-sectional: Screening

Garg et al. (21)	Dr. Ram Manohar Lohia Institute of Medical Science	Journal of Medical Virology	India	General sample in areas with varying prevalence of population referred to COVID laboratory	Original article	Cross-sectional: Screening
Hogan et al. (22)	Stanford University School of Medicine	JAMA Network Open	USA	Patients with flu-like Symptoms	Letter	Cross-sectional: Screening
Jung et al. (23)	University of Ulsan College of Medicine	JKMS	South Korea	Preoperative patients	Opinion	Cross-sectional: Screening
Lim et al. (24)	International Medical University	PLoS ONE	Malaysia	Contact tracing for COVID-19	Original article	Cross-sectional: Inquiry
Lohse et al. (25)	Saarland University Medical Center	The Lancet Infectious Diseases	Italy	Asymptomatic	Letter	Cross-sectional: Screening
Mastrianni et al. (26)	Saratoga Hospital	Journal of Hospital Medicine	USA	Patients at low risk of SARS-CoV-2 infection	Brief report	Cross-sectional: Screening
Möckel et al. (27)	Universitätsmedizin Berlin	European Journal of Emergency Medicine	Germany	Health professionals	Letter	Case report
Mohanty et al. (28)	India Institute of Medical Sciences	Journal of Medical Virology	India	Asymptomatic or symptomatic people that had contact with infected patients	Original article	Cross-sectional: Screening
Petrucca et al. (29)	Sant'Andrea Hospital; University of Rome	Infection Control and Hospital Epidemiology	Italy	Health professionals	Letter	Cross-sectional: Screening
Schmidt et al. (30)	German Red Cross Blood Transfusion Service; Goethe- University	Transfusion	Germany	Symptomatic patients and asymptomatic employees	Original article	Cross-sectional: Screening
Denny et al. (31)	Duke University	Morbidity and Mortality Weekly Report	USA	Asymptomatic	Brief Report	Cross-sectional: Screening
Kim et al. (11)	Asan Medical Center; University of Ulsan College of Medicine	JKMS	South Korea	Health professionals	Brief Report	Cross-sectional: Screening
Schneitler et al. (32)	Saarland University; University of Cologne	Annals of Global Health	Germany	Police staff, hospital inpatients, and nursing home residents	Original article	Case-control
Wang et al. (33)	Stanford University	Emerging Infectious Diseases	USA	Symptomatic and asymptomatic inpatients and	Original article	Case-control

outpatients

NA : not applied.

TABLE 2: Main characteristics of the pools by studies included in this review.

Reference	Country	Pools number	Total samples	Number of samples per pool	% Positive pools	% Positive sample	Sensitivity	Specificity
Abdalhamid et al. (2020)	USA	12	60	5	NS	3.33%	95% or 100%	100%
Ben-Ami et al. (2020)	Israel	3.322	26,576	8	NS	0.12%	NS	NS
Chong et al. (2020)	Australia	7.175	29,700	4; 8	0.84%	0.23%	99%	99%
Garg et al. (2020)	India	3.452	19,560	5; 10	7.39%	1.42%	95% or 100%	100%
Hogan et al. (2020)	USA	292	2,888	9; 10	0.68%	0.07%	NS	NS
Jung et al. (2020)	South Korea	NS	37,127	NS	NS	0.30%	NS	NS
Lim et al. (2020)	Malaysia	NS	2,732	5; 7; 10	NS	1.90%	NS	NS
Lohse et al. (2020)	Italy	267	1,191	4; 30	4.24%	1.93%	NS	NS
Mastrianni et al. (2020)	USA	179	530	2-3	2.23%	0.8%	60% to 80%	95% to 99%
Möckel et al. (2020)	Germany	1	10	10	0%	0%	NS	NS
Mohranty et al. (2020)	India	1.807	7,228	4	8.3%	3.47%	NS	NS
Petrucca et al. (2020)	Italy	407	2,035	5	8.84%	1.76%	100%	100%
Schmidt et al. (2020)	Germany	3.210	NS	10; 20; 30; 40; 50	NS	NS	NS	NS
Denny et al. (2020)	USA	NS	59,476	NS	n=158	n=29	NS	NS
Kim et al. (2020)	South Korea	NS	609	5	0%	0%	NS	NS
Schneitler et al. (2020)	Germany	6.012	25,978	5; 10; 13	14.6% (random); 1.2% (questionnaire)	3.5% (random); 0.1% (questionnaire)	NS	NS
Wang et al. (2021)	USA	302	1,648	8; 4	NS	5.83%	95%	NS

NS: not specified.

Large proportions of the study populations were diagnosed as asymptomatic, thus illustrating the usefulness of this method as a screening tool for the disease, especially in more vulnerable populations. The management of SARS-CoV-2 transmissibility depends on the identification of infected individuals through validated laboratory tests with good sensitivity, specificity, and precision³⁶. The expansion of diagnostic capacity through increased testing and rapid results plays a key role in supporting decision-making in response to the COVID-19 pandemic. In addition, diagnosis is essential to conduct serological research that determines viral circulation in the community, to monitor disease trends over time, and to assist in control measures³⁷. The inequalities found in access to health in several countries around the world make it difficult for low- and middle-income populations to perform diagnostic tests, especially the molecular test, which is currently considered the gold standard. Many individuals do not have adequate access to laboratory services in a timely manner, as they are in rural and remote areas or due to minimal financial resources^{37,38}.

The lack of diagnosis can generate a relatively low number of confirmed cases, with a great possibility of underestimating the data. One study has pointed out that low-income nations, like some African countries, have ineffective tests, underestimating incidence rates³⁹. Insufficient testing capacity in countries has become a barrier to case identification, quarantine, and contact tracing⁴⁰. Our study reveals that, at low prevalence locations, a pool size of around 30 appears to be effective³⁵, given the significant reduction in the number of tests (depending on the size of the pool, stages, and pool design) and consequent lack of resources. It is important to mention that the risk of false negatives in the samples may increase owing to dilution of positive samples¹². Thus, low- and middle-income countries, where COVID-19 could exert extreme pressure on low-resource health systems, can be major beneficiaries of this type of diagnostic

method⁴¹.

The prevalence of detection ranged from 0.84% to 14.6% and was higher in the general population and in health professionals. When discussing the screening of many people with no or few symptoms, establishing the correct pool for the given group tested according to COVID-19 prevalence can save up to 42% of reagents at a given prevalence of 10% in pools of 4 samples⁴². These values can be adjusted according to the region using mathematical models with the prevalence and number of samples. The pool method can offer an economical and effective approach to increase the virus testing capacity of medical laboratories without requiring more laboratory resources, such as laboratory workers, test reagents, and equipment⁴³. However, this method is not widely used, potentially due to a greater need for organization, systematization, and a multidisciplinary approach to create and adjust the pools. Pooling can help countries that are behind in testing by assessing specific groups, like essential workers and asymptomatic individuals⁴⁴, and provide opportunities to focus on other methods of control like contact tracing.

To prevent the spread of the virus, the detection of SARS-CoV-2 through pool testing has proven to be one of the key strategies to combat the pandemic. Along with the tracing, isolation, and regulation of contacts, detecting infected individuals is necessary to understand the evolution of the infection through statistics^{30,43}. Comprehensive testing of the population is important for understanding the curve and planning future strategies, which can be hampered due to the restriction of tests, reagents, and services⁴⁵. When planning laboratory operations, a well-coordinated strategy that uses a multidisciplinary team that understands the challenges mentioned above is more likely to succeed in such times of uncertainty⁴⁶.

Therefore, the pool testing method can drastically reduce costs when used with an appropriate organization, as it is more suitable in scenarios with a low prevalence of infection and in specific

populations, such as asymptomatic patients, company workers, and civil servants⁴⁴. In addition, there are current perspectives published regarding the use of pool testing in the general population as a surveillance strategy to detect new variants of SARS-CoV-2 and to evaluate the period of immunogenicity and global immunity provided by vaccines^{16,47}.

CONCLUSION

Diagnostic pool testing of COVID-19 is being performed in several locations around the world, including developed countries. The shortage of studies in developing countries, where the pandemic may continue unrestrained, is noteworthy. We suggest that other sites around the world use pool testing as a screening or detection method of SARS-CoV-2 to contain the virus' transmissibility, given the sensitivity and specificity of the previously described method.

Through combining the experience developed in universities, the organizational tools of public health providers, and the technological apparatuses of laboratories, pool testing can be one of the many strategies applied in widespread testing.

REFERENCES

1. Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(5):533-4.
2. Michelen M, Jones N, Stavropoulou C. In patients of COVID-19, What are the symptoms and clinical features of mild and moderate cases? [Internet] The Center for Evidence-Based Medicine. University of Oxford. 2020 [updated 2020 April 1st; cited 2021 Jan 23]. Available from: <https://www.cebm.net/COVID-19/in-patients-of-COVID-19-what-are-the-symptoms-and-clinical-features-of-mild-and-moderate-case>
3. Lipsitch M, Swerdlow D L, Finelli L. Defining the epidemiology of COVID-19 — studies

- needed. *N Engl J Med.* 2020;382(13):1194–6.
4. Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K, et al. Pooling RT-PCR test of SARS-CoV-2 for large cohort of “healthy” and infection-suspected patients: A prospective and consecutive study on 1,000 individuals. *Sci Rep.* 2020;10(18899):1-8.
 5. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Ann Intern Med.* 2020;173(5):362–7.
 6. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020;24:91–8.
 7. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Real-Time RT-PCR diagnostic panel for emergency use only. Atlanta: CDC; 2020. 72 p.
 8. Dorfman R. The detection of defective members of large populations. *Ann Math Statist.* 1943;14(4):436–40.
 9. Nguyen NT, Aprahamian H, Bish EK, Bish DR. A methodology for deriving the sensitivity of pooled testing, based on viral load progression and pooling dilution. *J Transl Med.* 2019;17(1):252.
 10. Bilder CR, Tebbs JM. Pooled-testing procedures for screening high volume clinical specimens in heterogeneous populations. *Stat Med.* 2012;31(27):3261–8.
 11. Kim SY, Lee J, Sung H, Lee H, Han MG, Yoo CK, et al. Pooling upper respiratory specimens for rapid mass screening of COVID-19 by real-time RT-PCR. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(10):2469–72.
 12. Cherif A, Grobe N, Wang X, Kotanko P. Simulation of pool testing to identify patients with coronavirus disease 2019 under conditions of limited test availability. *JAMA Netw Open.* 2020;3(6):e2013075.
 13. Mallapaty S. The mathematical strategy that could transform coronavirus testing. *Nature.* 2020;583(7817):504–5.

14. Žilinskas J, Lančinskas A, Guarracino MR. Pooled testing with replication: a mass testing strategy for the COVID-19 pandemics. *Sci Rep.* 2021;11:3459.
15. Mulu A, Alemayehu DH, Alemu F, Tefera DA, Wolde S, Aseffa G, et al. Evaluation of sample pooling for screening of SARS CoV-2. *PloS One.* 2021;16(2):e0247767.
16. Li Q, Wu J, Nie J, Zhang L, Hao H, Liu S, et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell.* 2020;182(5):1284-94.
17. Wacharapluesadee S, Kaewpom T, Ampoot W, Ghai S, Khamhang W, Worachotsueptrakun K, et al. Evaluating efficiency of pooling specimens for PCR-based detection of COVID-19. *J Med Virol.* 2020;92(10):2193-9.
18. Abdalhamid B, Bilder CR, McCutchen EL, Hinrichs SH, Koepsell SA, Iwen PC, et al. Assessment of specimen pooling to conserve SARS CoV-2 testing resources. *Am J Clin Pathol.* 2020;153(6):715–8.
19. Ben-Ami R, Klochendler A, Seidel M, Sido T, Gurel-Gurevich O, Yassour M, et al. Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 detection. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(9):1248–53.
20. Chong BSW, Tran T, Druce J, Ballard SA, Simpson JA, Catton M. Sample pooling is a viable strategy for SARS-CoV-2 detection in low- prevalence settings. *Pathology.* 2020;52(7):796–800.
21. Garg J, Singh V, Pandey P, Verma A, Sen M, Das A, et al. Evaluation of sample pooling for diagnosis of COVID-19 by real time-PCR: A resource-saving combat strategy. *J Med Virol.* 2020;93(3):1526–31.
22. Hogan CA, Sahoo MK, Pinsky BA. Sample pooling as a strategy to detect community transmission of SARS-CoV-2. *JAMA Netw Open.* 2020;323(19):1967-69.
23. Jung J, Kim M-N, Kim S-H. Universal screening with sample pooling in preoperative patients as long-term strategy in the COVID-19 pandemic. *J Korean Med Sci.* 2020;35(33):e309.

24. Lim KL, Johari NA, Wong ST, Khaw LT, Tan BK, Chan KK, et al. A novel strategy for community screening of SARS-CoV-2 (COVID-19): Sample pooling method. *PLoS One*. 2020;15(8):e0238417.
25. Lohse S, Pfuhl T, Berkó-Göttel B, Gärtner B, Becker SL, Schneitler S, et al. Challenges and issues of SARS-CoV-2 pool testing – Authors’ reply. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(11):1234–5.
26. Mastrianni D, Falivena R, Brooks T, McDermott B, Tan J, Vandell R, et al. Pooled Testing for SARS-CoV-2 in hospitalized patients. *J Hosp Med*. 2020;15(9):538–9.
27. Möckel M, Thibeault C, Stein A, Hofmann J, Gastmeier P. Daily pool testing of nasopharyngeal self-obtained swabs of healthcare professionals with definite COVID-19 exposition. *Eur J Emerg Med*. 2020;27(4):301–2.
28. Mohanty S, Ravindra A, Gupta K, Hallur V, Behera B, Mahapatra A, et al. Intricacies in characterizing positivity in pooled sample testing for SARS-CoV-2. *J Med Virol*. 2021;93:2799–804.
29. Petrucca A, Borro M, Lionetto L, Gentile G, Alari A, Simmaco M, et al. Validation of a small-size pooling approach targeting hospital surveillance of SARS-CoV-2 infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020;1–2.
30. Schmidt M, Hoehl S, Berger A, Zeichhardt H, Hourfar K, Ciesek S, et al. Novel multiple swab method enables high efficiency in SARS-CoV-2 screenings without loss of sensitivity for screening of a complete population. *Transfusion*. 2020; 60(10):2441–7.
31. Denny TN, Andrews L, Bonsignori M, Cavanaugh K, Datto MB, Deckard A, et al. Implementation of a pooled surveillance testing program for asymptomatic SARS-CoV-2 infections on a college campus
— Duke University, Durham, North Carolina, August 2–October 11, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2020;69(46):1743–7.
32. Schneitler S, Jung P, Bub F, Alhussein F, Benthien S, Berger FK, et al. Simple questionnaires

- to improve pooling strategies for SARS-CoV-2 laboratory testing. *Ann Glob Health*, 2020;86(1):148.
33. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA*. 2020;323(18):1843-4.
 34. Deckert A, Bärnighausen T, Kyei NN. Simulation of pooled-sample analysis strategies for COVID-19 mass testing. *Bull World Health Organ*. 2020;98(9):590–8.
 35. Deka S, Kalita D. Effectiveness of sample pooling strategies for SARS- CoV-2 mass screening by RT-PCR: A scoping review. *J Lab Physicians*. 2020;12(3):212–8.
 36. Kubina R, Dziedzic A. Molecular and serological tests for COVID-19 a comparative review of SARS-CoV-2 coronavirus laboratory and point- of-care diagnostics. *Diagnostics*. 2020;10(6):434.
 37. Peeling RW, Wedderburn CJ, Garcia PJ, Boeras D, Fongwen N, Nkengasong J, et al. Serology testing in the COVID-19 pandemic response. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(9):e245–9.
 38. Hengel B, Causer L, Matthews S, Smith K, Andrewartha K, Badman S, et al. A decentralised point-of-care testing model to address inequities in the COVID-19 response. *Lancet Infect Dis*. 2020;S1473-3099(20)30859-8.
 39. Oronce CIA, Scannell CA, Kawachi I, Tsugawa Y. Association between state-level income inequality and COVID-19 cases and mortality in the USA. *J Gen Intern Med*. 2020;35(9):2791–3.
 40. Dzinamarira T, Dzobo M, Chitungo I. COVID-19: A perspective on Africa’s capacity and response. *J Med Virol*. 2020;92(11):2465–72.
 41. Imai K, Tabata S, Ikeda M, Noguchi S, Kitagawa Y, Matuoka M, et al. Clinical evaluation of an immunochromatographic IgM/IgG antibody assay and chest computed tomography for the diagnosis of COVID-19. *J Clin Virol*. 2020;128:104393.
 42. Aragón-Caqueo D, Fernández-Salinas J, Laroze D. Optimization of group size in pool

- testing strategy for SARS-CoV-2: A simple mathematical model. *J Med Virol.* 2020;92(10):1988–94.
43. Chen F, Geng Z, Wang J, Liuchang W, Huang D, Xu Y, et al. Comparing two sample pooling strategies for SARS-CoV-2 RNA detection for efficient screening of COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93:2805-9.
44. Sunjaya AF, Sunjaya AP. Pooled testing for expanding COVID-19 mass surveillance. *Disaster Med Public Health Prep.* 2020; 14(3):42–3.
45. Chau CH, Strobe JD, Figg WD. COVID-19 clinical diagnostics and testing technology. *Pharmacotherapy.* 2020;40(8):857–68.
46. Loh TP, Horvath AR, Wang CB, Koch D, Adeli K, Mancini N, et al. Operational considerations and challenges of biochemistry laboratories during the COVID-19 outbreak: an IFCC global survey. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(9):1441–9.
47. Hodgson SH, Mansatta K, Mallett G, Harris V, Emary KRW, Pollard AJ. What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS- CoV-2. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(2):e26–35.

ARTIGO 2 - Investigação do SARS-CoV-2 por meio da RT-PCR em *pool testing* em indivíduos com suspeitos leves ou moderados da COVID-19

Murilo Soares Costa, Nathalia Sernizon Guimarães, Ana Paula Corrêa Oliveira Bahia, Lucas Haniel de Araújo Ventura, Hugo Itaru Sato, André Barbosa de Andrade, Luiza Passini Vaz-Tostes, Rhuan Braga Oliveira, Madara da Silva Simões, Gabriel de Oliveira Gelape, Ana Maria Caetano Faria, Claudia Regina Lindgren Alves, Elaine Leandro Machado, Flávio Guimarães da Fonseca, Santuza Maria Ribeiro Teixeira, Ricardo Hiroshi Caldeira Takahashi, Unai Tupinambás

INTRODUÇÃO

A transmissão do *Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) foi observada a partir de dezembro 2019 inicialmente em Wuhan, China e se alastrou rapidamente para todo o planeta. O vírus é transmitido por via respiratória e, na maioria dos casos, os sinais e sintomas estão relacionados a este sistema podendo também afetar o sistema gastrointestinal ou o neurológico, entre outros¹. De acordo com a intensidade dos sinais e sintomas e necessidade de intervenções médicas, o quadro clínico pode ser classificado em leve, moderado ou grave. A COVID-19 acometeu até novembro 2022 aproximadamente 630 milhões de pessoas e mais de 6,5 milhões mortes em todo mundo^{ab}.

^a WORLD HEALTH ORGANIZATION. Coronavirus. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1>acesso em 25 out 2022

^b JOHN HOPKINS UNIVERSITY. Coronavirus COVID-19 Global Cases by the Center for Systems Science and Engineering at John Hopkins University (JHU). 2020. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> Acessado em: 25 de out de 2022.

Na prática clínica, conhecer os sinais e sintomas auxilia o profissional a suspeitar ou descartar doenças. Desta forma, a partir da sintomatologia da doença causada pelo coronavírus 2019 (COVID-19) poderão ser solicitados exames diagnósticos, em especial a *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-qPCR) que permite a detecção do RNA viral com alta sensibilidade. Uma vez confirmado o diagnóstico, deve-se indicar o isolamento precoce para quebrar a cadeia de transmissão².

A testagem contínua em larga escala visa o diagnóstico precoce da COVID-19 é uma das estratégias da vigilância epidemiológica para avaliar a evolução da pandemia e as taxas de incidência, mortalidade, transmissibilidade e letalidade, além de permitir a identificação de casos suspeitos.

Aumentar o acesso aos testes diagnósticos é uma ferramenta fundamental para o controle da pandemia. A testagem por meio do *pool testing*, uma técnica de agrupamento de amostras para processamento e análise, é uma estratégia que possibilita ampliar este acesso. Caso o resultado do *pool* seja detectável ou positivo a análise é refeita individualmente para confirmação de qual ou quais amostras estavam detectáveis naquele agrupamento^{3,4}.

Neste sentido, o *pool testing* atua otimizando recursos, diminuindo custos laboratoriais, auxiliando na compreensão do quadro epidemiológico e na adoção de medidas para diminuição da circulação e transmissão de agentes infecciosos, de forma a contribuir para com o enfrentamento de epidemias⁴. Diante deste contexto, o objetivo dessa pesquisa foi descrever a investigação do SARS-CoV-2 por meio da RT-qPCR em *pool testing* e o perfil dos casos suspeitos leves a moderados da COVID-19.

MÉTODOS

Estudo transversal, ocorrido em uma Unidade de Pronto Atendimento (UPA) Centro-Sul de Belo Horizonte, Minas Gerais (MG), Brasil entre setembro de 2020 a março de 2021. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMG (CAAE 35074720.3.0000.5149).

A amostra por conveniência foi formada por todas as pessoas com idade igual ou maior a 18 anos, que procuraram o serviço médico da UPA com quadro leve e moderado com suspeita da COVID-19 e que aceitaram participar da pesquisa livremente durante o período de coleta de dados, foram excluídos os casos graves e maiores de 60 anos sem acompanhantes.

Ao aceitar participar da pesquisa e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, o voluntário foi entrevistado sobre questões sociodemográficas e clínicas por meio de um questionário próprio (Apêndice).

O material obtido por *swab* nasofaríngeo foi armazenado em um refrigerador até o momento da realização do *pool testing* seguindo o protocolo da RT-qPCR, com ajuste do *cut-off*. O número de amostras por *pool* variou de acordo com a incidência dos casos no município da semana anterior, podendo ser 3, 4, 8, 12 ou 16 amostras por *pool*. Caso o *pool* fosse positivo foi realizado a análise individual das amostras, para saber qual ou quais amostras estavam positivas ou negativas e qual o *Cycle threshold* (Ct) de cada amostra.

As informações foram armazenadas em um banco de dados específico da pesquisa. Os dados foram tabulados em uma planilha para análise. Os resultados laboratoriais foram enviados para os voluntários como arquivos PDF por aplicativo de mensagens.

RESULTADOS

Foram preparados 504 *pool* de amostras para investigação de 1.358 de casos suspeitos por meio da realização de RT-qPCR. Do total de pools testados, 33,86% tiveram resultado não detectável, gerado uma economia, pois foi necessário fazer 171 exames no formato de *pool* ao invés de 528 exames individuais. No entanto entre 333 *pools* com resultado positivo ou detectáveis foram identificadas 443 amostras positivas (32,6%) para o SARS-CoV-2 como mostrado na tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização do resultado do *pool testing*, dados sociodemográficos, clínicos, hábitos durante a pandemia e situação da renda em suspeitos leves e moderados da COVID-19 atendidos na UPA Centro-Sul de Belo Horizonte, 2020-2021 (n=1.358).

Características	Não detectável		Detectável		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>Pools</i>						
Número de <i>pool testings</i>	171	33,9	333	62,9	504	100
<i>Amostras</i>						
Número de amostras	915	67,4	443	32,6	1358	100
<i>Sexo</i>						
Masculino	391	66,5	197	33,5	588	43,3
Feminino	524	68,1	246	32,0	770	56,7
<i>Idade</i>						
18-24	187	70,0	80	30,0	267	19,7
25-29	148	70,1	63	29,9	211	15,5
30-34	132	71,7	52	28,3	184	13,5
35-39	100	63,7	57	36,3	157	11,6

40-44	106	74,1	37	25,9	143	10,5
45-49	74	67,3	36	32,7	110	8,1
50-54	46	66,7	23	33,3	69	5,1
55-59	45	60,8	29	39,2	74	5,4
60-64	28	52,8	25	47,2	53	3,9
65-69	22	57,9	16	42,1	38	2,8
70+	27	51,9	25	48,1	52	3,8
Raça/cor						
Preto	248	71,7	98	28,3	346	25,5
Pardo	425	66,2	217	33,8	642	47,3
Branco	200	64,5	110	35,5	310	22,8
Amarelo	37	68,5	17	31,5	54	4,0
Indígena	5	83,3	1	16,7	6	0,4
Escolaridade						
Sem escolaridade	9	75,0	3	25,0	12	0,9
Ensino fundamental						
incompleto	164	69,2	73	30,8	237	17,5
Ensino fundamental						
completo	61	64,9	33	35,1	94	6,9
Ensino médio incompleto						
Ensino médio completo	73	67,0	36	33,0	109	8,0
Ensino médio completo						
Superior incompleto	363	68,4	168	31,6	531	39,1
Superior incompleto						
Superior completo	128	66,3	65	33,7	193	14,2
Superior completo						
Pós-graduação incompleta	80	67,2	39	32,8	119	8,8
Pós-graduação incompleta						
Pós-graduação completa	16	76,2	5	23,8	21	1,5
Pós-graduação completa						
	21	50,0	21	50,0	42	3,1

Sinais e sintomas						
Febre	374	60,5	244	39,5	618	45,5
Dor ocular	386	61,5	242	38,5	628	46,2
Cefaleia	734	67,2	358	32,8	1092	80,4
Dor de garganta	545	69,3	242	30,8	787	58,0
Tosse	637	63,7	363	36,3	1000	73,6
Dificuldade para respirar	374	69,3	166	30,7	540	39,8
Anosmia	296	56,4	229	43,6	525	38,7
Coriza	544	68,6	249	31,4	793	58,4
Congestão nasal	451	66,5	227	33,5	678	49,9
Ageusia	335	58,9	234	41,1	569	41,9
Perda do apetite	420	62,6	251	37,4	671	49,4
Náusea	381	67,3	185	32,7	566	41,7
Vômito	156	69,0	70	31,0	226	16,6
Diarreia	325	68,6	149	31,4	474	34,9
Dor no peito ou costas	508	65,9	263	34,1	771	56,8
Taquicardia	212	67,5	102	32,5	314	23,1
Fadiga	617	66,6	310	33,4	927	68,3
Mialgia	424	63,8	241	36,2	665	49,0
Artralgia	226	60,0	151	40,1	377	27,8
Comorbidades	(n=321)		(n=163)		(n=484)	
Hipertensão	143	63,3	83	36,7	226	46,7
Cardiopatia	43	71,7	17	28,3	60	12,4
Diabetes	45	57,0	34	43,0	79	16,3
Asma	89	74,8	30	25,2	119	24,6

Bronquite	106	70,7	44	29,3	150	31,0
Enfisema	5	83,3	1	16,7	6	1,2
Doença Pulmonar						
Obstrutiva Crônica	10	83,3	2	16,7	12	2,5
Câncer	17	65,4	9	34,3	26	5,4
Doença crônica nos rins	11	64,7	6	35,3	17	3,5
Outra doença crônica	71	65,1	38	34,9	109	22,5
Atividades realizadas até o dia da pesquisa						
Fica em casa o tempo todo	35	53,9	30	46,2	65	4,8
Sai apenas para coisas essenciais						
	68	60,2	45	39,8	113	8,3
Sai de vez em quando para diversas atividades						
	71	62,3	43	37,7	114	8,4
Sai todos os dias (trabalho/outras atividades/convive na rua)						
	741	69,5	325	30,5	1066	78,5
Alguém te visitou em casa nas últimas duas semanas						
	452	67,9	214	32,1	666	49,0
Conhecimento e/ou contato com algum caso de COVID-19						
Conhece alguém que teve COVID-19						
	701	65,9	363	34,1	1064	78,4
Teve contato com alguém que teve COVID-19						
	474	65,5	250	34,5	724	53,3
Meio de transporte						
Ônibus/Van	540	71,2	219	28,9	759	55,9

Carro ou moto pessoal	117	50,0	117	50,0	234	17,2
A pé	85	72,0	33	28,0	118	8,7
Uber	61	61,6	38	38,4	99	7,3
Ônibus e metrô	28	65,1	15	34,9	43	3,2
Bicicleta	3	75,0	1	25,0	4	0,3
Metrô	7	70,0	3	30,0	10	0,7
Outros	14	45,2	17	54,8	31	2,3
Situação do emprego/renda						
Não teve alteração	536	68,8	243	31,2	779	57,4
Redução de carga horária						
sem prejuízo no salário	48	85,7	8	14,3	56	4,1
Redução de carga horária						
com prejuízo no salário	76	57,1	57	42,9	133	9,8
Antecipação de férias	18	69,2	8	30,8	26	1,9
Demissão						
Aposentado ou pensionista	46	54,1	39	45,9	85	6,3
Recebeu benefício do						
governo	83	68,0	39	32,0	122	9,0
Já estava desempregado	21	77,8	6	22,2	27	2,0
Outro	37	66,1	19	33,9	56	4,1

DISCUSSÃO

A disseminação do coronavírus pelo mundo evidenciou a necessidade da testagem para confirmação diagnóstica e medidas de isolamento dos casos confirmados. Desta forma, os testes rápidos e laboratoriais foram amplamente divulgados e ofertados de forma gratuita ou paga. A

RT-qPCR é considerada o padrão-ouro para detecção do SARS-CoV-2 e seu alto custo impede o acesso a todos de modo gratuito.

Com esta pesquisa observamos que a técnica em *pool testing* foi viável a ser utilizado no serviço de saúde para pessoas sintomáticas suspeitadas da COVID-19, pois 33,9% dos 504 dos *pool testings* foram não detectáveis, 443 amostras deram positivas para o SARS-CoV-2, sendo 32,6%. Em uma revisão mostrou que estudos feitos ao redor do mundo utilizando *pool testing* para investigação do SARS-CoV-2, foram em: 29,4% da população geral, 23,5% em profissionais de saúde, 23,5% em paciente assintomáticos, 11,8% em pacientes com sintomas moderados e 11,8% em pacientes hospitalizados que não fosse por COVID-19, ao todo foram 217.348 amostras que tiveram a montagem dos *pools* variou de 2 a 50 amostras, já o número de *pool testings* processados foi de 1 a 7.175, com positividade de 0,68% a 14,6%, que ao serem feitos de forma individual apresentou de 0,07% a 5,83% de casos detectáveis individuais².

Houve uma maior presença de mulheres (n=770), e 56,7% dos casos positivos foram neste sexo, com a faixa etária entre 18-24 anos (n=267; 19,7%), porém a maior porcentagem de casos positivos foi em pessoas com 70 anos ou mais (n=25; 48,1%), pessoas pardas (n=642; 47,3%), que concluíram o ensino médio (n=531; 39,1%),

O sintoma mais comum foi cefaleia (n=1.092; 80,4%), porém a maior porcentagem encontrada em casos positivos foi a anosmia (n=229; 43,6%). Entre os casos confirmados, 12% apresentavam alguma comorbidade. Struyf *et al* (2020) mostram que há inúmeros sinais e sintomas que podem ocorrer durante a COVID-19, logo todos devem ser investigados, no entanto chama atenção a prevalência da anosmia, neste estudo.

Estudo realizado na cidade de Ponta Grossa, estado do Paraná (PR), Brasil com 379 pacientes atendidos no serviço especializado para COVID-19 mostrou que 57% dos atendimentos foram mulheres, 16,7% foram em pessoas acima de 60 anos, e entre os que

informaram a escolaridade a maior porcentagem foram nos que concluíram o ensino médio, com 22,2%; dos que responderam sobre comorbidades foram 26,1%, eles relataram que tinham um ou mais comorbidades, e os sinais e sintomas mais relatados foram relacionados ao trato respiratório com 72,6%⁵. Outro estudo que discorreu sobre os padrões de distanciamento social em nove cidades do estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil, apresentou que a amostra utilizada também tinha uma prevalência maior entre as mulheres, com 58,9%, além da maior parcela da escolaridade ser no ensino médio com 31,7%⁶.

Neste estudo 78,5% (n=1.066) das pessoas tinham que sair de casa todos os dias, e 78,35% (n=1.064) conheciam alguém que teve COVID-19 até o dia do teste. Já no estudo de Ponta Grossa/PR, 9,2% tiveram contato com algum caso suspeito ou confirmado para COVID-19⁵. No que se refere aos entrevistados do estudo do RS, 41,1% relatam que estavam bastante distanciados socialmente e 44,5% afirmaram que estavam saindo somente para coisas essenciais⁶.

Os estudos realizados em Ponta Grossa/PR⁵ e nas cidades do RS⁶ não questionaram sobre o meio de transporte e como ficou a situação da renda durante a pandemia enquanto a pesquisa da UPA apontou que 55,9% (n=759) dos entrevistados relataram que faziam uso de ônibus/Van. Medlock e colaboradores (2021) relatam sobre o valor do transporte seguro durante a COVID-19 para evitar a disseminação do vírus.

CONCLUSÃO

Este estudo mostra que o *pool testing* na RT-qPCR pode ser utilizado como uma estratégia para diagnóstico laboratorial para COVID-19, mostrando que ao invés de fazer 528 exames individuais foram necessários somente 171 exames em *pool*, reduziu custos e otimizou

recursos. O método de agrupamento de amostras (*pool testing*) mostrou-se aplicável, e pode ser recomendado principalmente em situações de baixa prevalência, visando a redução de custos.

As mulheres buscaram o serviço de saúde mais em comparação com os homens, bem como a faixa etária mais elevada estava mais propensa a casos positivos de infecção leve ou moderada. Entre eles há casos positivos com comorbidades. Nota-se que há um espectro de sinais e sintomas que devem ser considerados suspeitos, até o resultado do teste laboratorial.

A pesquisa em Belo Horizonte mostrou que diversas pessoas tiveram que sair das casas, seja para alguma atividade essencial ou não, se expondo ao vírus, sendo que os meios de transporte mais utilizados foram ônibus ou van.

Como limitação do estudo está a não abertura dos pools não detectáveis para confirmação e não realização da coleta de dados em outra UPA. No entanto, essa pesquisa contribui para sociedade por meio da saúde pública devido aumentar a testagem do exame padrão-ouro e por ser mais sustentável.

REFERÊNCIAS

1. STRUYF T, DEEKS JJ, DINNES J, TAKWOINGI Y, DAVENPORT C, LEEFLANG MMG, SPIJKER R, HOO% L, EMPERADOR D, DITTRICH S, DOMEN J, HORN SR A, VAN DEN BRUEL A. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. Cochrane Database of Systematic Reviews 2020, Issue 7. Art. No.: CD013665. DOI: 10.1002/14651858.CD013665.

2. COSTA, M. S., GUIMARÃES, N. S., ANDRADE, A. B., VAZ-TOSTES, L. P., OLIVEIRA, R. B., SIMÕES, M., GELAPE, G. O., ALVES, C., MACHADO, E. L., FONSECA, F., TEIXEIRA, S., SATO, H. I., TAKAHASHI, R., & TUPINAMBÁS, U.. Detection of SARS-CoV-2 through pool testing for COVID-19: an integrative review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2021, 54, e0276. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0276-2021>
3. DORFMAN R. The Detection of Defective Members of Large Populations. *Ann Math Stat.* 1943;14(4):436–40. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177731363>
4. MALLAPATY S. The mathematical strategy that could transform coronavirus testing. *Nature.* 2020;583(7817), 504–505. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02053-6>
5. BRASIL, Daniele et al. COVID-19 tents: specialized triage service, a temporal analysis of the patients' profile. *Revista Brasileira de Enfermagem* [online]. 2021, v. 74, suppl 1 [Accessed 25 October 2022], e20200687. Available from: <<https://doi.org/10.1590/0034-7167-2020-0687>>. Epub 05 Feb 2021. ISSN 1984-0446. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2020-0687>.
6. BARROS, Aluisio J D et al. Social distancing patterns in nine municipalities of Rio Grande do Sul, Brazil: the Epicovid19/RS study. *Revista de Saúde Pública* [online]. 2020, v. 54 [Acessado 25 Outubro 2022] , 75. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2020054002810>>. Epub 24 Jul 2020. ISSN 1518-8787. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2020054002810>.

7. MEDLOCK KB 3RD, TEMZELIDES T, HUNG SYE. COVID-19 and the value of safe transport in the United States. *Sci Rep.* 2021 Nov 4;11(1):21707. doi: 10.1038/s41598-021-01202-9. PMID: 34737382

ARTIGO 3 - Autocoleta de *swab* nasofaríngeo e teste molecular em *pool testing* como estratégias para detecção de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2): viabilidade em estudantes de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2021

Nathalia Sernizon Guimarães¹; Murilo Soares Costa²; Elaine Leandro Machado³; Hugo Itaru Sato⁴; Eduarda de Carvalho Maia e Amaral⁵; Rafaela Galvão Arivabene⁵; Karine Lima Lourenço⁴; Unai Tupinambás⁶; Flávio Guimarães da Fonseca⁴; Ricardo Hiroshi Caldeira Takahashi⁷; Santuza Maria Ribeiro Teixeira⁴; Claudia Regina Lindgren Alves⁸

1 Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, Ouro Preto, MG, Brasil

2 Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Belo Horizonte, MG, Brasil

3 Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Medicina Preventiva e Social, Belo Horizonte, MG, Brasil

4 Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Tecnologia de Vacinas, Belo Horizonte, MG, Brasil

5 Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, MG, Brasil

6 Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Clínica Médica, Belo Horizonte, MG, Brasil

7 Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Matemática, Belo Horizonte, MG, Brasil

8 Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Pediatria, Belo Horizonte, MG, Brasil

Resumo

Objetivo: Demonstrar a viabilidade da utilização combinada da autocoleta de *swab* nasofaríngeo e *pool testing* para detecção do SARS-CoV-2 em inquéritos epidemiológicos. **Métodos:** O estudo envolveu amostra de 154 estudantes da Universidade Federal de Minas Gerais, que realizaram a autocoleta do *swab* nasofaríngeo em cabines individuais e sem supervisão. O teste molecular foi realizado utilizando-se a técnica de *pool testing*. **Resultados:** A obtenção de amostras durou cerca de 5 minutos por pessoa. Realizou-se análise para detecção de RNA endógeno em 40 amostras e os resultados indicaram que não houve falhas decorrentes da autocoleta. Nenhum dos *pools* detectou presença de RNA viral. O custo da realização do teste molecular (RT-PCR) por *pool testing* com amostras obtidas por autocoleta foi cerca de dez vezes menor do que nos métodos habituais. **Conclusão:** As estratégias investigadas mostraram-se economicamente viáveis e válidas para a pesquisa de SARS-CoV-2 em inquéritos epidemiológicos.

Palavras-chave: COVID-19; Inquéritos Epidemiológicos; Pandemia, *Pool Testing*, RT-PCR, SARS-CoV-2.

Abstract

Objective: To show the feasibility of using combined nasopharyngeal swab auto-collection and pool testing to detect SARS-CoV-2 in epidemiological surveys. **Methods:** The study involved a sample of 154 students from the Universidade Federal de Minas Gerais, who performed the self-collection of the nasopharyngeal swab in individual booths without supervision. Molecular testing was performed using the pool testing technique. **Results:** Obtaining samples lasted about 5 minutes each. Analysis was performed to detect endogenous

RNA in 40 samples, and the results indicated that no failures resulted from self-collection. None of the pools detected the presence of viral RNA. The cost of performing the molecular test (RT-PCR) by pool testing with samples obtained by self-collection was about 10 times lower than with the usual methods. **Conclusion:** The investigated strategies showed to be economically feasible and valid for the research of SARS-CoV-2 in epidemiological surveys.

Keywords: COVID-19; Epidemiological Inquiries; Pandemic, Pool Testing, RT-PCR, SARS-CoV-2.

Resumen

Objetivo: Demostrar la viabilidad de utilizar el uso combinado de la autocollección de *swabs* nasofaríngeos y *pool testing* para la detección del SARS-CoV-2 en encuestas epidemiológicas. **Métodos:** El estudio involucró a una muestra de 154 estudiantes de la Universidade Federal de Minas Gerais, quienes realizaron la autocollección del hisopo nasofaríngeo en cabinas individuales sin supervisión. La prueba molecular se realizó utilizando la técnica de prueba de grupo. **Resultados:** La obtención de muestras duró unos 5 minutos por persona. Se realizó un análisis para detectar RNA endógeno en 40 muestras y los resultados indicaron que no hubo fallas derivadas de la autocollección. Ninguno de los grupos detectó la presencia de RNA viral. El costo de realizar una prueba molecular (RT-PCR) por pool con muestras obtenidas por auto-recolección fue aproximadamente 10 veces menor que con los métodos habituales. **Conclusión:** Las estrategias investigadas demostraron ser económicamente viables y válidas para la investigación del SARS-CoV-2 en encuestas epidemiológicas.

Palabras-clave: COVID-19; Investigaciones Epidemiológicas; Pandemia, *Pool Testing*, RT-PCR, SARS-CoV-2.

Introdução

A COVID-19 (*Coronavirus Disease-19*), doença causada pelo SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), já acometeu mais de 200 milhões de indivíduos e causou mais de 4 milhões de mortes em todo mundo, 13% delas no Brasil.¹ Apesar de a vacinação no país ter-se iniciado em janeiro de 2021, cumpre manter um sistema de vigilância epidemiológica capaz de detectar precocemente eventuais surtos e promover ações de contenção da transmissão da doença.²

Há preocupação com grupos sob elevado risco de contágio, a exemplo da comunidade escolar no retorno às atividades presenciais.³ Nos Estados Unidos, a estratégia de testagem em *pool* de indivíduos assintomáticos foi adotada na Duke University e nas escolas do estado de Massachussets, no retorno às atividades presenciais, visando rastrear e deter a propagação do vírus.^{3,4}

O *pool testing* consiste na realização do teste molecular RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Protein Chain Reaction*) simultaneamente, em grupos de amostras.⁴ Essa técnica tem sido utilizada em vários países, por ser econômica e eficaz para testagem populacional.^{3,5,6} Em indivíduos assintomáticos, a realização do *pool testing* auxilia na detecção precoce, permitindo interromper a cadeia de transmissão, especialmente em grupos com maior exposição ao SARS-CoV-2.^{3,6-9}

A autocoleta também representa uma opção econômica para testagem em massa, pois não necessita de profissionais treinados e equipamentos de proteção individual (EPI). Estudos comparativo de amostras de *swab* nasofaríngeo coletadas por profissionais de saúde e por autocoleta mostraram resultados semelhantes.^{8,9}

Dada a urgência de aumentar a cobertura de testes para COVID-19, o objetivo do

estudo foi demonstrar a viabilidade da utilização combinada da autocoleta de *swab* nasofaríngeo com *pool testing* para detecção do SARS-CoV-2 em inquéritos epidemiológicos.

Métodos

A presente experiência, de delineamento transversal, realizada em fevereiro de 2021, é um subprojeto de pesquisa longitudinal prospectiva conduzida em Belo Horizonte, MG, com o objetivo de avaliar a expansão da realização de RT-PCR para SARS-CoV-2 por *pool testing* em pessoas com síndrome gripal.

Todos os estudantes do 9° ao 12° períodos do curso de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, no cumprimento dos estágios hospitalares obrigatórios, foram convidados a participar do estudo. Caso aceitassem, responderiam um questionário para caracterização da amostra com informações sobre idade (em anos), sexo (masculino; feminino) e serviço onde realizava o estágio hospitalar. O questionário foi respondido pelo Google Forms. A constituição da amostra de participantes foi de conveniência, sem cálculo amostral prévio.

Os participantes forneceram amostras de *swab* nasofaríngeo, obtidas por autocoleta realizada em cabines individuais, sem supervisão direta de profissionais, e contou com a exposição de cartazes sobre a técnica. Os estudantes também receberam vídeo instrucional sobre a autocoleta, antes do procedimento. O *swab* foi descartado em recipiente próprio, dentro das próprias cabines. O tubo contendo a amostra e solução de inativação e transporte viral¹⁰ foi identificado, lacrado e entregue aos pesquisadores, que aguardavam do lado de fora das cabines.

Para preparação dos *pools*, foram adicionados 47 microlitros de cada amostra individual em microtubos de 1,5 mL. As amostras foram processadas para extração de RNA, segundo o protocolo da empresa QIAGEN Inc. (Alemanha). As reações RT-PCR foram realizadas com as

sondas para o gene endógeno da RNaseP humana e o gene (E) que codifica o envelope viral, utilizando-se o termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo Charité.¹¹ Na estratégia de testagem em *pool*, se o resultado de um *pool* é detectável, faz-se necessário o processamento individual de todas as amostras presentes nesse agrupamento.⁵ As amostras ficaram estocadas a 4°C.

Conforme descrito na literatura, quando a prevalência de COVID-19 na comunidade é de 1%, o tamanho ótimo do *pool* é de 11 amostras (Quadro 1).^{12,13} Considerando-se que nenhum dos participantes estava sintomático no momento da coleta, optou-se pela testagem em *pools* de dez amostras, o que seria adequado para detectar RNA viral mesmo com carga viral muito baixa.¹²⁻¹⁴ Foram preparados 15 *pools* contendo dez amostras e um *pool* com quatro amostras.

Após o processamento das amostras em *pool*, quatro *pools* de dez amostras foram processados individualmente, para avaliar possíveis falhas no processo de auto-coleta. Nesta etapa, procurou-se verificar se as amostras continham RNA endógeno do indivíduo. O cálculo do número de amostras/*pools* necessários para essa verificação foi realizado com o uso do *software* MatLab, estimando-se 90% de probabilidade de detectar pelo menos uma amostra inadequada caso tivessem ocorrido erros em 5% das amostras.

Os resultados foram apresentados a partir de frequências absolutas e relativas. Os custos, em reais, para extração e reação do RT-PCR individual e em *pool*, considerando-se apenas os materiais plásticos e reagentes, foram calculados com base nos valores de mercado praticados em agosto de 2021 e disponíveis em sites eletrônicos dos fornecedores de produtos biomédicos. Foram incluídos no cálculo os equipamentos de proteção individual (EPI) necessários para realização da coleta das amostras de *swab* nasofaríngeo, se esta fosse realizada por um profissional de saúde e não por auto-coleta. Foram realizadas, também, simulações de custos, caso alguns dos *pools* apresentassem resultado detectável, utilizando-se o programa Excel. A simulação considerou o custo dos procedimentos realizados em amostras individuais

ou em *pools*, a partir do custo dos materiais e insumos calculados na etapa anterior.

O projeto do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CEP/UFMG): Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 35074720.3.0000.5149. Todos os estudantes incluídos na amostra assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em formato eletrônico.

Quadro 1 – Estimativa de tamanhos ótimos de *pools* para realização de RT-PCR para SARS-CoV-2,^a segundo a prevalência de COVID-19 na comunidade

Prevalência de COVID-19 na comunidade(%)	Tamanho ótimo do <i>pool</i> (número de amostras por <i>pool</i>)
1	11
2	8
3	6
4	6
5	5
6	5
7	4
8	4
9	4
10	4
20	3

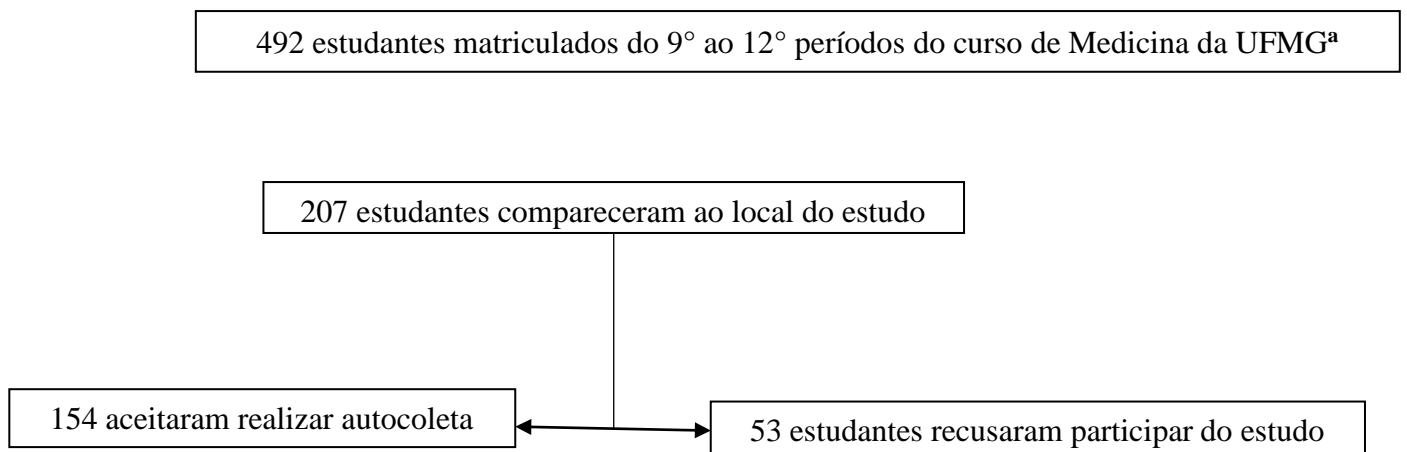
Fonte: Costa et al.¹² e Cherif et al.¹³

a) RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Protein Chain Reaction*) para SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*).

Resultado

Dos 492 estudantes matriculados do 9° ao 12° períodos, 207 (42,1%) compareceram nos dias previamente agendados pelo Colegiado de curso para realização de procedimentos acadêmicos, sendo que 154 aceitaram participar da pesquisa (74,4% dos presentes nos dias agendados). Mais da metade dos participantes era do sexomascuino (54,7%) e tinha entre 20 e 24 anos de idade (56,0%). Todos os participantes realizavam estágio curricular obrigatório em hospitais da rede pública de saúde do município.

Dos 207 estudantes presentes na Faculdade de Medicina nos dias de realização do estudo, 53 recusaram-se a realizar a autocoleta do *swab* (25,6%). As principais justificativas para a recusa foram: experiência ruim em testagem prévia (n=12), receio da autocoleta (n=12), falta de disponibilidade para participar naquele momento (n=10), realização de RT-PCR recentemente (n=10) e outros motivos (n=9). A Figura 1 apresenta as etapas de composição da amostra.



Motivos da recusa:

- Experiência ruim em testagem prévia (n=12)
- Receio da autocoleta (n=12)
- Falta de disponibilidade para participar naquele momento (n=10)
- Realização de RT-PCR^b recentemente (n=10)
- Outros motivos (n=9)

a) UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

b) RT-PCR: *Reverse Transcriptase-Protein Chain Reaction* para SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*).

Figura 10 – Fluxograma para composição da amostra do estudo, composta de estudantes do 9° ao 12° períodos do curso de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, cursando estágios hospitalares obrigatórios, Belo Horizonte, 2021

A obtenção de amostras durou cerca de 5 minutos por pessoa. Todos os participantes receberam o resultado da testagem após dois dias úteis. Em nenhum dos *pools* foi detectada a presença de RNA viral. O RNA endógeno foi detectado adequadamente nas 40 amostras examinadas individualmente para analisar a qualidade do material obtido por autocoleta.

A Tabela 1 apresenta os custos do procedimento adotado no presente estudo, comparados aos custos do procedimento habitual (coleta de *swab* por um profissional de saúde e processamento individual das amostras) e a outros cenários hipotéticos. O valor final por amostra, no presente estudo, foi cerca de dez vezes menor do que o valor por amostra no procedimento habitual. O custo por amostra aumenta progressivamente, à medida que mais *pools* apresentam resultado detectável. Mesmo se metade dos *pools* precisassem ser processados individualmente, realizando autocoleta do *swab* e testagem inicial em *pools* de dez amostras, o valor por amostra corresponderia à metade do valor estimado no procedimento habitual.

Discussão

Os resultados mostraram que, em relação à técnica de autocoleta, (i) houve adesão da maioria dos convidados, (ii) necessitou-se de infraestrutura mínima e (iii) a autocoleta pôde ser realizada rapidamente, resultando em amostras com qualidade aceitável. A detecção do RNA endógeno, nas 40 amostras avaliadas individualmente, sugere que não ocorreram erros na autocoleta do *swab* nasofaríngeo.

Com relação à estratégia de autocoleta, em estudo conduzido nos Estados Unidos, Guest et al. demonstraram que a maioria das amostras de esfregaço orofaríngeo coletadas pelos próprios participantes foram adequadas para o teste de RNA de SARS-CoV-2.¹⁵ A ausência de falhas significativas no processo de autocoleta favorece a realização de inquéritos populacionais ou com grupos específicos, dispensando a presença de profissional treinado, aumentando a capacidade de testagem, reduzindo a exposição do profissional de saúde e os custos com EPIs, indispensáveis nesse procedimento.⁸ Portanto, os resultados da presente pesquisa indicam que a autocoleta é um recurso útil para vigilância da infecção por COVID-19 em indivíduos assintomáticos.

Observou-se resistência de parte dos universitários em realizar o procedimento, se não por simples por temor, pela lembrança de experiências anteriores desagradáveis. Esses elementos sugerem a necessidade de maior sensibilização da população-alvo, no sentido de promover a adesão à autocoleta.⁹ Entretanto, a maioria dos convidados aderiu à autocoleta e foi capaz de realizar o procedimento com as instruções recebidas.

O custo médio dos procedimentos depende da prevalência da COVID-19 na comunidade: quanto maior a prevalência, maior a probabilidade de as amostras terem de ser processadas individualmente.¹²⁻¹⁴ A análise das amostras obtidas por autocoleta utilizando *pool testing* mostrou-se mais econômica do que se as amostras fossem analisadas individualmente,

inclusive em cenários hipotéticos, nos quais alguns *pools* mostrassem resultados detectáveis.

Para coletar, processar e apresentar os resultados, foram necessários dois dias úteis. A rápida liberação dos resultados permite a adoção de ações de vigilância epidemiológica cabíveis, o que é particularmente relevante para o controle de surtos em comunidades fechadas, como as de estudantes e trabalhadores.^{3,4,7-9} A qualidade das amostras foi verificada, validando o resultado encontrado. A técnica de *pool testing* viabilizou a testagem rápida de número relativamente grande de pessoas, com importante redução dos custos.

Como limitação do estudo, aponta-se que o tamanho da amostra foi menor do que o esperado. A pesquisa foi realizada em dois dias, quando todos os estudantes de medicina cursando os estágios obrigatórios deveriam comparecer à universidade para procedimentos acadêmicos. No entanto, muitos estudantes optaram por realizar tais procedimentos remotamente, reduzindo o número de elegíveis para o estudo. Apesar disso, o número de participantes foi suficiente para o delineamento proposto. Estudos de viabilidade são relevantes para a Saúde Pública, podem contribuir com o planejamento e realização de estudos maiores. Seria interessante manter o monitoramento desses estudantes, adotando-se as estratégias descritas, desde que continuem a atuar em cenários com maior risco de contaminação pelo SARS-CoV-2.

Conclui-se que as estratégias de autocoleta de *swab* nasofaríngeo e *pool testing*, utilizadas em conjunto, produzem economia de tempo, recursos materiais e humanos, mostrando-se economicamente viáveis, seja para a realização de inquéritos populacionais, seja na agilização de medidas para contenção de surtos de COVID-19.

Referências

1. Johns Hopkins University. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and

- Engineering (CSSE) [Internet]. Baltimore: Johns Hopkins University & Medicine, 2021 [cited 2021 Aug 09]. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
2. Hallal PC, Horta BL, Barros AJD, Dellagostin OA, Hartwig FP, Pellanda LC, et al. Evolução da prevalência de infecção por COVID-19 no Rio Grande do Sul, Brasil: inquéritos sorológicos seriados. *Cad Saude Colet.* 2020;25(Suppl 1):2395-401. doi: [10.1590/1413-81232020256.1.09632020](https://doi.org/10.1590/1413-81232020256.1.09632020)
 3. Denny TN, Andrews L, Bonsignori M, Cavanaugh K, Datto MB, Deckard A, et al. implementation of a pooled surveillance testing program for asymptomatic SARS- CoV-2 infections on a College Campus - Duke University, Durham, North Carolina. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(46):1743-7. doi: [10.15585/mmwr.mm6946e1externalicon](https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6946e1externalicon)
 4. Paykamian B. Massachusetts Schools Try Pool Testing for COVID-19. California: Government technology: technology for state and local government, 2021 [cited 2021 Feb 25]. Available from: <https://www.govtech.com/education/k-12/Massachusetts-Launches-COVID-19-Pool-Testing-for-Schools-After-Pilot.html>
 5. Hogan CA, Sahoo MK, Pinsky BA. Sample pooling as a strategy to detect community transmission of SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020;323(19):1967-9. doi: [10.1001/jama.2020.5445](https://doi.org/10.1001/jama.2020.5445)
 6. Ben-Ami R, Klochendler A, Seidel M, Sido T, Gurel-Gurevich O, Yassour M, et al. Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS- CoV-2 detection. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(9):1248-53. doi: [10.1016/j.cmi.2020.06.009](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.009)
 7. Ranzani OT, Bastos LSL, Gelli JGM, Marchesi JF, Baião F, Hamacher S, et al. Characterisation of the first 250 000 hospital admissions for COVID-19 in Brazil: a retrospective analysis of nationwide data. *Lancet Respir Med.* 2021;9(4):407-18. doi: [10.1016/S2213-2600\(20\)30560-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30560-9)
 8. Tan SY, Tey HL, Lim ETH, Toh ST, Chan YH, Tan PT, et al. The accuracy of healthcare worker versus self-collected (2-in-1) Oropharyngeal and Bilateral Mid-Turbinate (OPMT)

- swabs and saliva samples for SARS-CoV-2. Plos One 2020;15(12):e0244417. doi: [10.1371/journal.pone.0244417](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244417)
9. Tu YP, Jennings R, Hart B, Cangelosi GA, Wood RC, Wehber K, et al. Patient- collected tongue, nasal, and mid-turbinate swabs for SARS-CoV-2 yield equivalent sensitivity to health care worker collected nasopharyngeal swabs. MedRxiv. 2021. doi: [10.1101/2020.04.01.20050005](https://doi.org/10.1101/2020.04.01.20050005)
 10. Carvalho AF, Rocha RP, Gonçalves AP, Silva TBS, Sato HI, Vuitika L, et al. The use of denaturing solution as collection and transport media to improve SARS-CoV-2 RNA detection and reduce infection of laboratory personnel. Braz J Microbiol. 2021;52:531-9. doi: [10.1007/s42770-021-00469-4](https://doi.org/10.1007/s42770-021-00469-4)
 11. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill, 2020;25(3):2000045. doi: [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045)
 12. Costa MS, Sato HI, Rocha RP, Carvalho AF, Guimarães NS, Machado EL, et al. Adjusting the cut-off and maximum pool size in RT-qPCR pool testing for SARS-CoV-2. Viruses 2021;13(4):557. doi: [10.3390/v13040557](https://doi.org/10.3390/v13040557)
 13. Cherif A, Grobe N, Wang X, Kotanko P. Simulation of pool testing to identify patients with coronavirus disease 2019 under conditions of limited test availability. JAMA Netw Open. 2020;3(6):e2013075. doi: [10.1001/jamanetworkopen.2020.13075](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.13075)
 14. Regen F, Eren N, Heuser I, Hellmann-Regen J. A simple approach to optimum poolsize for pooled SARS-CoV-2 testing. Int J Infect Dis. 2020;100:324-6. doi: [10.1016/j.ijid.2020.08.063](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.063)
 15. Guest JL, Sullivan PS, Valentine-Graves M, Valencia R, Adam E, Luisi N, et al. Suitability and sufficiency of telehealth clinician-observed, participant-collected samples for SARS-CoV-2 testing: the iCollect cohort pilot study. JMIR Public Health Surveill. 2020;6(2):e19731. doi: [10.2196/19731](https://doi.org/10.2196/19731)

Tabela 4 – Custos, em reais, dos materiais e reagentes para realização do procedimento adotado no presente estudo,^a comparado com o procedimento habitual^b e outros cenários hipotéticos, para a testagem de estudantes do 9^o ao 12^o períodos do curso de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, cursando estágios hospitalares obrigatórios, Belo Horizonte, 2021

Materiais e reagentes, por procedimentos	Preço unitário^e (R\$)	Número de amostras	Valor dos materiais e reagentes (R\$)	Total (pool + testes individuais) (R\$)	Valor final por amostra (R\$)
Procedimento adotado na pesquisa^a					
RT-PCR processado em <i>pools</i> ***	36,96	16	591,36	591,36	3,84
Procedimento habitual^c					
EPI para coleta de <i>swab</i> ^d	3,00	154	462,00	6.153,84	39,96
RT-PCR processado individualmente	36,96	154	5.691,84		
Outros cenários hipotéticos com autocoleta do <i>swab</i> + processamento de 150 amostras, inicialmente em <i>pools</i> de dez amostras					
Cenário 1					
14 <i>pools</i> não detectáveis + 1 <i>pool</i> Detectável	36,96	15	554,40	924,00	6,16
10 amostras processadas individualmente	36,96	10	369,60		
Cenário 2					
13 <i>pools</i> não detectáveis + 2 <i>pools</i> Detectáveis	36,96	15	554,40	1.293,60	8,62
20 amostras processadas individualmente	36,96	20	739,20		
Cenário 3					
12 <i>pools</i> não detectáveis + 3 <i>pools</i> Detectáveis	36,96	15	554,40	1.663,20	11,09
30 amostras processadas individualmente	36,96	30	1.108,80		
Cenário 4					
11 <i>pools</i> não detectáveis + 4 <i>pools</i> Detectáveis	36,96	15	554,40	2.032,80	13,55
40 amostras processadas individualmente	36,96	40	1.478,40		
Cenário 5					
10 <i>pools</i> não detectáveis + 5 <i>pools</i> Detectáveis	36,96	15	554,40	2.402,40	16,02
50 amostras processadas individualmente	36,96	50	1.848,00		
Cenário 6					

9 <i>pools</i> não detectáveis + 6 <i>pools</i> Detectáveis	36,96	15	554,40	2.772,00	18,48
60 amostras processadas individualmente	36,96	60	2.217,60		
Cenário 5					
8 <i>pools</i> não detectáveis + 7 <i>pools</i> Detectáveis	36,96	15	554,40	3.141,60	20,94
70 amostras processadas individualmente	36,96	70	2.587,20		

a) Autocoleta do *swab* nasofaríngeo + RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Protein Chain Reaction* para SARS-CoV-2) realizado em *pool testing*; b) Coleta do *swab* nasofaríngeo por profissional de saúde + processamento individual do RT-PCR; c) 15 *pools* com 10 amostras e 1 *pool* com 4 amostras (total = 154 participantes), sendo todos os *pools* com resultado não detectável; d) Considerando-se todos os EPIs (equipamento de proteção individual) necessários para um profissional trabalhar 8 horas/dia e coletar 154 *swabs* nasofaríngeos (máscara PFF2, *faceshield*, luvas, capotes, toucas e aventais), excluindo os custos com profissional para coleta; e) Valores praticados em agosto de 2021.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio desta pesquisa nota-se que *pool testing* pode reduzir a quantidade de insumos para realização da RT-qPCR, e também ser utilizado para fazer mais testes, além de otimização de tempo da liberação dos resultados e recursos financeiros (caso os *pools* sejam não detectáveis), logo a utilização desse método é melhor empregado em baixas taxas de incidência e/ou prevalência, como analisado nos casos suspeitos leves ou moderados da COVID-19 em relação aos acadêmicos de medicina que estavam assintomáticos.

A revisão integrativa elucidou que não havia estudos sobre *pool testing* para detecção do SARS-CoV-2 nos continentes: Africano, América Central e do Sul; os estudos foram realizados em pessoas assintomáticas para COVID-19 e foi demonstrado a atuação das Universidades para auxiliar na testagem.

Com os acadêmicos de medicina demonstrou-se eficaz a realização da autocoleta, reduziu custos e neste aspecto também garantiu a qualidade das amostras, outra medida demonstrada foi a utilização do *pool testing* para este público (ou grupos assintomáticos), pois todos os *pools* foram não detectáveis e ao analisar de forma individual comprovou-se que os *pools* deram o resultado correto e que as amostras tinham sido coletadas de forma correta e estavam não detectáveis.

Como limitação do estudo, nota-se que os *pools* da UPA Centro Sul não foram abertos para conferência e testado de forma individual como contraprova, visto que, este procedimento foi adotado em quase metade dos *pools* processados provenientes da autocoleta dos acadêmicos de medicina da UFMG e demonstrado sua validação interna.

Em relação aos casos sintomáticos do serviço de saúde encontrou-se uma maior parcela de pessoas do sexo feminino em busca da assistência à saúde, bem como a

positividade foi maior em pessoas acima de 70 anos, apesar das pessoas jovens e adultas terem buscado mais o serviço de saúde; a maioria dos casos ocorreram em pessoas pretas ou pardas e apresentaram um espectro de sinais e sintomas.

O método em *pool testing* para RT-qPCR da detecção do SARS-CoV-2 pode ser replicado em laboratórios centrais, regionais e/ou municipais, auxiliando para aumentar a testagem da população e desta maneira compreender melhor o cenário da transmissão da doença da COVID-19, ampliando a oferta da testagem com o exame padrão-ouro para casos suspeitos leves e moderados atendidos na atenção primária, UPAs, ou outros serviços que foram montados para atendimento desses casos em diversos locais no Brasil. Além de ser um estratégia para o retorno às aulas em escolas, universidades e rotina de testes para profissionais de saúde.

Ele pode ser utilizado para manter a testagem devido casos de reinfeção, mesmo após vacinação e vigilância/monitoramento das novas cepas. Outro ponto importante é descrever o perfil sociodemográfico local para adaptação de políticas públicas visando melhorar o combate e mitigação da doença.

Além de que, por meio do sistema de vigilâncias no Brasil o *pool testing* pode ser útil na vigilância epidemiológica pois com o aumento da oferta dos testes irá descobrir novos casos a serem notificados, já na sanitária pode fiscalizar laboratório aptos para realização da técnica, para a ambiental nota-se que este método reduz insumos e é mais sustentável e para saúde do trabalhador o *pool testing* pode ser utilizado para realizar exames periódicos aos profissionais da linha de frente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. D., & TYRRELL, D. A. J. **The Morphology of Three Previously Uncharacterized Human Respiratory Viruses that Grow in Organ Culture.** *Journal of General Virology*, 1967; 1(2), 175–178. doi:10.1099/0022-1317-1-2-175

BARAT B, DAS S, DE GIORGI V, et al. **Pooled Saliva Specimens for SARS-CoV-2 Testing.** *J Clin Microbiol.* 2021;59(3):e02486-20. Published 2021 Feb 18. doi:10.1128/JCM.02486-20

BEECHING, N.; FLETCHER, T.; BEADSWORTH, M. **Covid-19: testing times.** *BMJ* 2020;369:m1403

BEN-AMI R, KLOCHENDLER A, SEIDEL M, et al. **Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-qPCR for SARS-CoV-2 detection.** *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(9):1248-1253. doi:10.1016/j.cmi.2020.06.009

BÖGER B, FACHI MM, VILHENA RO, COBRE AF, TONIN FS, PONTAROLO R. **Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19.** *Am J Infect Control.* 2021;49(1):21-29. doi:10.1016/j.ajic.2020.07.011

BOOBALAN J, DINESHA TR, GOMATHI S, et al. **Pooled nucleic acid testing strategy for monitoring HIV-1 treatment in resource limited settings.** *J Clin Virol.* 2019;117:56-60. doi:10.1016/j.jcv.2019.05.012

BRASIL, Ministério da saúde. **Fluxograma para atendimento e detecção precoce de COVID-19 em pronto atendimento UPA 24 horas e unidade hospitalar não definida como referência.** Disponível em:

<https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/05/Fluxogramas-COVID-19-SAES-1.pdf> Acesso em: 21 jun 2020.

BRAULT V, MALLEIN B, RUPPRECHT JF. **Group testing as a strategy for COVID-19 epidemiological monitoring and community surveillance.** PLoS Comput Biol. 2021;17(3):e1008726. Published 2021 Mar 4. doi:10.1371/journal.pcbi.1008726

CANDIDO DS, CLARO IM, DE JESUS JG, et al. **Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil.** Science. 2020; 369 (6508): 1255-1260. doi:10.1126/science.abd2161

CARVALHO, A.F., ROCHA, R.P., GONÇALVES, A.P. et al. **The use of denaturing solution as collection and transport media to improve SARS-CoV-2 RNA detection and reduce infection of laboratory personnel.** Braz J Microbiol. 2021; 52, 531–539. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00469-4>

CORMAN, V.M.; LANDT, O.; KAISER, M.; MOLENKAMP, R.; MEIJER, A.; CHU, D.K.W.; BLEIKER, T.; BRUNINK, S.; SCHNEIDER, J.; SCHMIDT, M.L.; et al. **Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.** Euro. Surveill. 2020; 25, 1–8. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>

COSTA, M. S., SATO, H. I., ROCHA, R. P., CARVALHO, A. F., GUIMARÃES, N. S., MACHADO, E. L., ALVES, C., TEIXEIRA, S., TAKAHASHI, R., TUPINAMBÁS, U.,

& DA FONSECA, F. G. . **Adjusting the Cut-Off and Maximum Pool Size in RT-qPCR Pool Testing for SARS-CoV-2.** *Viruses*, 2021; 13(4), 557.
<https://doi.org/10.3390/v13040557>

COSTA, M. S., GUIMARÃES, N. S., ANDRADE, A. B., VAZ-TOSTES, L. P., OLIVEIRA, R. B., SIMÕES, M., GELAPE, G. O., ALVES, C., MACHADO, E. L., FONSECA, F., TEIXEIRA, S., SATO, H. I., TAKAHASHI, R., & TUPINAMBÁS, U.. **Detection of SARS-CoV-2 through pool testing for COVID-19: an integrative review.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2021, 54, e0276.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0276-2021>

CUI J, LI F, SHI Z-L. **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses.** *Nat Rev Microbiol*, 2019;17(3):181–92.

DAVIES J, DAVIES D. **Origins and evolution of antibiotic resistance.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(3):417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-1

DORFMAN, Robert. **The detection of defective members of large populations.** *Annals of Mathematical Statistics.* 1943; 14:436–440.

EL-SAYED A, KAMEL M. **Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases.** *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020;27(18):22336-22352.
doi:10.1007/s11356-020-08896-w

FENG, Wei; ZONG, Wei; WANG, Feng; JU, Shaoqing. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a review.** *Molecular Cancer*. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01218-1>.

GUIMARÃES, N. S., COSTA, M. S., MACHADO, E. L., SATO, H. I., AMARAL, E., ARIVABENE, R. G., LOURENÇO, K. L., TUPINAMBÁS, U., FONSECA, F., TAKAHASHI, R., TEIXEIRA, S., & ALVES, C. (2022). **Autocoleta de swab nasofaríngeo e teste molecular em pool testing como estratégias para detecção de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2): viabilidade em estudantes de medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.** *Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil*, 31(1), e2021409. <https://doi.org/10.1590/S1679-49742022000100002>

JOHN HOPKINS UNIVERSITY. **Coronavirus COVID-19 Global Cases by the Center for Systems Science and Engineering at John Hopkins University (JHU).** 2020. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> Acessado em: 20 de maio de 2022.

KAMPF, G.; TODT, D.; PFAENDER, S.; STEINMANN, E. **Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents.** *Journal of Hospital Infection*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022>.

KÄSTNER A, LÜCKER P, SOMBETZKI M, et al. **SARS-CoV-2 surveillance by RT-qPCR-based pool testing of saliva swabs (lollipop method) at primary and special schools-A pilot study on feasibility and acceptability.** *PLoS One*. 2022;17(9):e0274545. Published 2022 Sep 13. doi:10.1371/journal.pone.0274545

KEVADIYA BD, MACHHI J, HERSKOVITZ J, et al. **Diagnostics for SARS-CoV-2 infections**. Nat Mater. 2021;20(5):593-605. doi:10.1038/s41563-020-00906-z

KHATAMI F, SAATCHI M, ZADEH SST, et al. **A meta-analysis of accuracy and sensitivity of chest CT and RT-PCR in COVID-19 diagnosis**. Sci Rep. 2020;10(1):22402. Published 2020 Dec 28. doi:10.1038/s41598-020-80061-2

KIM D, LEE JY, YANG JS, KIM JW, KIM VN, CHANG H. **The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome**. Cell. 2020;181(4):914-921.e10. doi:10.1016/j.cell.2020.04.011

LAI C-C, SHIH T-P, KO W-C, TANG H-J, HSUEH P-R. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and corona virus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges**. Int J Antimicrob Agents 2020;105924.

LI, Ruiyun; PEI, Sem; CHEN, Bin; SONG, Yimeng; ZHANG, Tao; YANG, Wan; SHAMAN, Jeffrey. **Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV2)**. Science. 2020 doi: 10.1126/science.abb3221.

LIANG LL, TSENG CH, HO HJ, WU CY. **Covid-19 mortality is negatively associated with test number and government effectiveness**. Sci Rep. 2020;10(1):12567. Published 2020 Jul 24. doi:10.1038/s41598-020-68862-x

MALLAPATY, Smriti.. **The mathematical strategy that could transform Coronavirus Testing.** Nature. 583, 504-505p. 2020

MANABE YC, SHARFSTEIN JS, ARMSTRONG K. **The Need for More and Better Testing for COVID-19.** JAMA. 2020;324(21):2153-2154.
doi:10.1001/jama.2020.21694

McMAHON EJ, FANG C, LAYUG L, SANDLER SG. **Pooling blood donor samples to reduce the cost of HIV-1 antibody testing.** Vox Sang. 1995;68(4):215-219.
doi:10.1111/j.1423-0410.1995.tb02575.x

MOLLAEI HR, AFSHAR AA, KALANTAR-NEYESTANAKI D, FAZLALIPOUR M, AFLATOONIAN B. **Comparison five primer sets from different genome region of COVID-19 for detection of virus infection by conventional RT-PCR.** Iran J Microbiol. 2020;12(3):185-193

OGDEN NH, GACHON P. **Climate change and infectious diseases: What can we expect?.** Can Commun Dis Rep. 2019;45(4):76-80. Published 2019 Apr 4.
doi:10.14745/ccdr.v45i04a01

PEIRIS J, GUAN Y, YUEN K. **Severe acute respiratory syndrome.** Nat Med. 2004;10(12):S88–97.

PYRC K, BERKHOUT B, VAN DER HOEK L. **Identification of new human coronaviruses.** Expert Review of Anti-infective Therapy. 2007;5(2):245–53.

RAHMAN A, SARKAR A. **Risk factors for fatal middle east respiratory syndrome coronavirus infections in Saudi Arabia: analysis of the WHO Line List, 2013–2018.**

Am J Public Health. 2019;109(9):1288–93.

REILLY M, CHOCHAN B. **Pooled testing for SARS-CoV-2, options for efficiency**

at scale. Bull World Health Organ. 2021;99(10):708-714.

doi:10.2471/BLT.20.283093

RIO DE JANEIRO, Governo do Estado. **Procedimento operacional padrão: coleta, acondicionamento, conservação e transporte de swab COVID-19.** Disponível em:

[https://coronavirus.rj.gov.br/wp-](https://coronavirus.rj.gov.br/wp-content/uploads/2020/04/POP_Amostras_BiologicasCOVID19.pdf)

[content/uploads/2020/04/POP_Amostras_BiologicasCOVID19.pdf](https://coronavirus.rj.gov.br/wp-content/uploads/2020/04/POP_Amostras_BiologicasCOVID19.pdf) . Acesso em 21 jun 2020.

SALCEDO N, HARMON A, HERRERA BB. **Pooling of Samples for SARS-CoV-2 Detection Using a Rapid Antigen Test.** Front Trop Dis. 2021;2:707865. Published 2021

Aug 5. doi:10.3389/fitd.2021.707865

SILVA, Luiz Jacintho da. **A Globalização da doença.** Revista de Saúde Pública. 2003;

37(3):273-274. doi.org/10.1590/S0034-89102003000300001.

SHEREEN MA, KHAN S, KAZMI A, BASHIR N, SIDDIQUE R. **COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses.** J Adv Res.

2020;24:91-98. Published 2020 Mar 16. doi:10.1016/j.jare.2020.03.005

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS. **Métodos laboratoriais para diagnóstico da COVID-19.** Disponível em: <https://www.sbac.org.br/blog/2020/03/25/metodos-laboratoriais-para-diagnostico-da-covid-19/> . Acesso em 21 jun 2020.

STRUYF T, DEEKS JJ, DINNES J, TAKWOINGI Y, DAVENPORT C, LEEFLANG MMG, SPIJKER R, HOOFL, EMPERADOR D, DITTRICH S, DOMEN J, HORN SR A, VAN DEN BRUEL A. **Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease.** Cochrane Database of Systematic Reviews. 2020, Issue 7. Art. No.: CD013665. DOI: 10.1002/14651858.CD013665.

TYRRELL, D. A. J., & BYNOE, M. L. **Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures.** BMJ. 1965; 1(5448), 1467–1470. doi:10.1136/bmj.1.5448.1467

VOGELS CBF, BRITO AF, WYLLIE AL, et al. **Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets.** Nat Microbiol. 2020; 5(10):1299-1305. doi:10.1038/s41564-020-0761-6

WANG N, SHI X, JIANG L, ZHANG S, WANG D, TONG P, et al. **Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4.** Cell Res. 2013;23(8):986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020**. World Health Organization, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Coronavirus**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1>acesso em 11 nov 2022

XIE Y, WANG Z, LIAO H, MARLEY G, WU D, TANG W. **Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of the COVID-19 in the current pandemic: systematic review and meta-analysis**. BMC Infect Dis. 2020;20(1):640. Published 2020 Aug 31. doi:10.1186/s12879-020-05371-2

YELIN, I.; AHARONY, N.; TAMAR, E. S., ARGOETTI, A.; MESSER, E.; BERENBAUM, D.; SHAFRAN, E.; KUZLI, A.; GANDALI, N.; SHKEDI O. **Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi-sample pools**. *Clinical Infectious Diseases*. 2020; ciaa531, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa531>.

ŽILINSKAS J, LANČINSKAS A, GUARRACINO MR. **Pooled testing with replication as a mass testing strategy for the COVID-19 pandemics**. *Sci Rep*. 2021;11(1):3459. Published 2021 Feb 10. doi:10.1038/s41598-021-83104-4.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – RESOLUÇÃO CNS Nº466/2012

Avaliação da identificação da COVID-19 em pacientes com Síndromes Gripais atendidos nos Centros Especializados de COVID-19 em Belo Horizonte e acompanhamento por telemonitoramento

Apresentação e objetivo do estudo: A adoção de medidas preventivas efetivas para o controle da COVID-19 depende do conhecimento da real magnitude da doença na população, para isso, se faz necessário o aumento da capacidade de testagem nos municípios. O objetivo geral deste estudo é avaliar a expansão da proporção de indivíduos com infecções ativas de SARS-CoV-2 por meio da testagem do *pool testing* em indivíduos com sintomas de quadros gripais leves assistidos pela rede do Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Este projeto de pesquisa é uma das ações propostas pelo Comitê Permanente de Acompanhamento das Ações de Prevenção e Enfrentamento do novo Coronavírus, sob a coordenação do Prof. Unai Tupinambás.

Participação no estudo: O (A) sr.(a) é convidado a participar deste projeto que envolve a realização de uma entrevista face a face com algumas perguntas sobre sua situação de saúde e dados sociodemográficos e que pode levar aproximadamente 15 minutos e coleta de amostra de *swab* nasofaringe por meio da inserção de um “cotonete” no nariz, para a realização do exame.

Para a coleta a amostra de *swab* será introduzido um uma haste de plástico (parecido com um cotonete) nas narinas paralelamente ao palato, para realização do exame, depois a amostra será colocada em um tubo com um meio de cultura viral para depois serem armazenadas, transportada, realizado o exame e depois descartada. A coleta será feita por um profissional treinado, paramentado e a partir de procedimentos adequados. Todos os procedimentos de segurança serão adotados pela equipe de coleta visando minimizar risco de disseminação da infecção por COVID-19. Sendo assim, pedimos sua autorização para coleta, transporte, utilização e descarte (seguindo as normas de biossegurança de resíduos biológicos) da amostra de *swab* nasal. Esse material cedido será transportado para o Laboratório CT-Vacinas no mesmo dia da coleta, localizado Parque Tecnológico de Belo Horizonte (bairro Engenho Nogueira), armazenado em uma caixa térmica com temperatura entre 2° a 8°C, sob a responsabilidade do pesquisador Unai Tupinambás. Após a realização do exame a amostra será desprezada seguindo os protocolos de descarte de material biológico.

O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **Avaliação da identificação da COVID-19 em pacientes com Síndromes Gripais atendidos nos Centros Especializados de COVID-19 em Belo Horizonte e acompanhamento por telemonitoramento**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Rubrica do Participante de pesquisa ou responsável: _____
 Rubrica do pesquisador: _____

O resultado de seu exame será informado por telefone. Caso seu resultado seja positivo, faremos um monitoramento diário por telefone por 60 dias após o resultado, as ligações serão realizadas entre segundas-feiras as sextas-feiras e podem levar aproximadamente 10 minutos. Esse acompanhamento é importante para compreendermos a evolução clínica da doença.

Custos, riscos e benefícios: A coleta de *swab* pode acarretar desconforto local e irritação na garganta, lacrimejamento reflexo e pode causar sangramento em poucos casos, logo, todo cuidado será tomado para evitar estes desconfortos e a coleta será realizada por técnico capacitado e paramentado. Se seu resultado for positivo, você receberá atendimento de saúde consistente com esse diagnóstico, recebendo tratamento precoce em caso de agravamento do quadro, assim melhorando o prognóstico da resposta à doença. Ao receber o diagnóstico da COVID-19, você deverá se isolar no domicílio, evitando o aumento da transmissibilidade da doença. Além disso, os contatos dos indivíduos infectados tornam-se cientes do risco de terem sido infectados, sendo incentivados a buscar os serviços de saúde para serem também testados.

Sigilo e confidencialidade: Os pesquisadores garantem que toda a informação é considerada CONFIDENCIAL e que a sua identificação será mantida como informação sigilosa. Toda a informação será guardada apenas com um número, sem conter o seu nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão apresentados sem nenhuma forma de identificação individual. Não haverá nenhuma contribuição em dinheiro (ressarcimento ou ajuda de custo) pela participação na pesquisa. Em relação a ligação telefônica jamais será perguntado dados pessoais, por este motivo em caso de “linha cruzada” nenhuma informação pessoal será ouvida, somente informações sobre a evolução da doença, a coleta do exame do *swab* nasal.

A participação do(a) Sr.(a) é fundamental, sendo importante que ocorra em todas as etapas da pesquisa, no entanto é de caráter voluntário. O(A) Sr.(a) poderá se recusar a responder alguma questão da entrevista, deixar de realizar a coleta de secreção nasal e ainda interromper sua participação na pesquisa a qualquer momento. Caso decida não participar do estudo ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na instituição. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa. Em caso de dúvida, o (a) Sr.(a) poderá me perguntar ou entrar em contato com o Dr. Unai Tupinambás, pesquisador responsável deste projeto na Faculdade de Medicina da UFMG, na Av. Alfredo Balena, 190 ou email: unai@ufmg.br ou com pesquisador, doutorando, Murilo Soares Costa, Faculdade de Medicina da UFMG, na Av. Alfredo Balena, 190, ou pelo telefone (31) 99652-8791 ou email: murilosoasta@gmail.com. Também poderá entrar em contato em caso de dúvidas relacionado aos aspectos éticos com Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, na Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade administrativa II, 2º andar, sala 2005 - Pampulha - Belo Horizonte/MG ou pelo telefone (31) 3409-4592, E-mail: coep@prpq.ufmg.br.

Considerando, que fui informado (a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações). Estou ciente que receberei uma via desse documento.

Belo Horizonte/MG, ____ de _____ de _____

Assinatura do participante

Ass do Pesq. Responsável

Ass. Pesquisador – Doutorando

APÊNDICE B

QUESTIONÁRIO - UPA Centro Sul – Doutorando: Murilo Soares Costa

Nº do atendimento _____

- 1) **Código da pesquisa:** _____
 - 2) Nome: _____
 - 3) **Telefones:** () _____ () _____ () _____
 - 4) Endereço: _____ Nº: _____
Complemento: _____ Bairro/Cidade: _____
 - 5) **Sexo:** () **Masculino** () **Feminino**
 - 6) Idade ou data de nascimento: _____ ou ____/____/____
 - 7) **Como você se classifica em termos de cor ou raça?**
() **Preta** () **Parda** () **Branca** () **Amarela** () **indígena**
 - 8) Pessoa em situação de rua? () Não () Sim
 - 9) **Profissão:** _____
 - 10) **Além de você, quantas pessoas moram na sua casa?** _____
 - 11) Quantos cômodos tem na sua casa? _____
 - 12) **Escolaridade (estudou até que série)?**
() sem escolaridade
() ensino fundamental incompleto () ensino fundamental completo
() ensino médio incompleto () ensino médio completo
() superior incompleto () superior completo
() pós-graduação incompleta () pós-graduação completa
- Nas últimas duas semanas você teve:**
- 13) Febre? () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 14) **Dor nos olhos?** () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 15) Dor de cabeça? () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 16) **Dor de garganta?** () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 17) Tosse? () **Sim**. Há quantos dias? _____ Com catarro? () Sim ou () Não () **Não**
 - 18) **Dificuldade para respirar?** () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 19) Sentiu menos cheiro? () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 20) **Nariz escorrendo/coriza?** () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 21) Nariz entupido/congestão nasal? () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 22) **Sentiu menos gosto?** () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 23) Perda de apetite? () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 24) **Náusea/enjoo?** () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 25) Vômito? () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 26) **Diarreia?** () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 27) Dor no peito ou costas? () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 28) **Coração acelerou/disparou, palpitação ou bateteira?** () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 29) Fadiga/cansaço? () **Sim**. Há quantos dias? _____ () **Não**
 - 30) **Dor muscular?** () **Sim**. Há quantos dias? _____ Qual(is) local(is)? _____ () **Não**
 - 31) Dor nas articulações? () **Sim**. Há quantos dias? _____ Qual(is) local(is)? _____ () **Não**

Você tem?

- 32) Hipertensão/pressão alto? () **Sim** () **Não**
- 33) **Outra doença no coração?** () **Sim** () **Não**
- 34) Diabetes/açúcar no sangue? () **Sim** () **Não**
- 35) **Asma?** () **Sim** () **Não**
- 36) Bronquite? () **Sim** () **Não**
- 37) **Enfisema?** () **Sim** () **Não**
- 38) DPOC? () **Sim** () **Não**
- 39) **Câncer (qualquer tipo)?** () **Sim** () **Não**
- 40) Insuficiência renal crônica/doença crônica nos rins? () **Sim** () **Não**
- 41) **Outra doença crônica?** () **Sim** () **Não**
- 42) **Como tem sido sua rotina de atividades nas últimas duas semanas?**
- () Fica em casa o tempo todo
- () Sai apenas para coisas essenciais, como comprar comida
- () Sai de vez em quando para diversas compras e outras atividades
- () Sai todos os dias para trabalhar ou outra atividade regular ou convive na rua
- 43) Além das pessoas que moram com você, mais alguém te visitou na sua casa nas últimas duas semanas? () **Sim** () **Não**
- 44) **Conhece alguém que teve COVID-19?** () **Sim** () **Não**
- 45) Teve contato com alguém que teve COVID-19? () **Sim** () **Não**
- 46) **Ao sair de casa você usa máscara de forma correta (tampando boca e nariz):**
- () **Todas as vezes** () **A maioria das vezes** () **Mais ou menos** () **Poucas vezes** () **Não uso máscara**
- 47) **Como ficou a situação de trabalho e remuneração durante a pandemia?**
- () Não teve alteração
- () Redução de carga horária sem prejuízo no salário
- () Redução de carga horária com prejuízo no salário
- () Antecipação de férias
- () Demissão
- () Aposentado
- () Pensionista
- () Recebeu benefício do governo
- () Já estava desempregado
- () Outro _____
- 48) **Faz uso de qual tipo de transporte?**
- () Ônibus/Van
- () Carro ou moto pessoal
- () A pé
- () Outros _____
- 49) Alguma pessoa que mora na mesma casa testou positivo e participou a pesquisa? () **Sim** () **Não**
- 50) Qual nome? _____
- 51) Tomou a vacina contra COVID-19? () **Sim** Dose? _____ () **Não**

APÊNDICE C

Adjusting the Cut-Off and Maximum Pool Size in RT-qPCR Pool Testing for SARS-CoV-2

Murilo S. Costa¹, Hugo I. Sato², Raissa P. Rocha², Alex F. Carvalho², Nathalia S. Guimarães³, Elaine L. Machado⁴, Claudia R. L. Alves⁵, Santuza M. R. Teixeira², Ricardo H. C. Takahashi⁶, Unai Tupinambás⁷ and Flávio G. da Fonseca^{2*}

1 Graduate Program in Infectology and Tropical Medicine, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, MG, Brazil; murilosc@ufmg.br

2 Vaccine Technology Center, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31310-260, MG, Brazil; hugosato@ufmg.br (H.I.S.); raissa-biotec@ufmg.br (R.P.R.); alexficar@gmail.com (A.F.C.); santuzat@ufmg.br (S.M.R.T.)

3 Graduate Program in Health and Nutrition, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto 35400-000, MG, Brazil; nathalia.guimaraes@aluno.ufop.edu.br

4 Department of Preventive and Social Medicine, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, MG, Brazil; elainelm@ufmg.br

5 Department of Pediatrics, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, MG, Brazil; lindgren@ufmg.br

6 Department of Mathematics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; taka@mat.ufmg.br

7 Department of Internal Medicine, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, MG, Brazil; unai@ufmg.br

*Correspondence: fdafonseca@icb.ufmg.br

Abstract: Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) to detect SARS-CoV-2 RNA is an essential test to monitor the occurrence of COVID-19. A methodology is proposed for the determination of maximum pool size and adjustments of cut-off values of cycle threshold (Ct in RT-qPCR pool testing, to compensate for the dilution caused by pooling. The trade-off between pool size and test sensitivity is stated explicitly. The procedure was designed to ensure that samples that would be detectable in individual testing remain detectable in pool testing. The proposed relaxation in cut-off is dependent on the pool size, allowing a relatively tight correction to avoid loss of detection of positive samples. The methodology was evaluated in a study of pool testing of adults attending a public emergency care unit, reference for COVID-19 in Belo Horizonte, Brazil, and presenting flu-like symptoms. Even samples on the edge of detectability in individual testing were detected correctly. The proposed procedure enhances the consistency of RT-qPCR pool testing by enforcing that the scales of detectability in pool processing and in individual sample processing are compatible. This may enhance the contribution of pool testing to large-scale testing for COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; pool testing; RT-qPCR

Introduction

Most SARS-CoV-2-infected patients either present symptoms indistinguishable from other flu-like syndromes or remain asymptomatic. Therefore, the effective control of the epidemics requires testing large numbers of people regularly. The reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the most sensitive test for detecting SARS-CoV-2 shortly after the infection. However, its widespread application is limited by the cost of reagents, the need for specific laboratory equipment, sample transport logistics, and the long processing time [1–3].

Pool testing is a method of grouping samples to be tested together, to reduce costs and quicken the process. The number of samples on each pool should vary according to the infection's prevalence [1–3]. If viral RNA is detected in a pool, each sample must be tested individually to identify the virus-positive ones. If the virus is not detected, all samples are considered non-detectable [1–3]. Pool testing allows substantial savings in test average cost and average time for delivering results. These characteristics are especially relevant to expand the testing coverage in scenarios with limited resources. As a shortcoming, if a sample with low viral load is included in a pool with negative samples, the reduced concentration of viral RNA in the pool can produce a false-negative result [4,5].

The usual criterion for discrimination between positive and negative results is based on the definition of a maximum value for the Ct (cycle threshold) necessary to amplify the viral RNA in the sample up to a detectable level. Samples that become detectable with a Ct greater than a pre-determined cut-off value Ct are interpreted as negative since the detected fluorescence is likely to represent noise. The authors of Reference [5] report that, in their experiments, the Ct value in pooled samples is increased by a factor of 1.24 for each increase of dilution by a factor of 2. Other works also report experiments in which changes of the Ct value in pooled samples are observed [6,7]. Although the authors of Reference [6] advise the “need for careful experimental design” due to that effect, no explicit guidelines for adapting the detection procedures for pool testing are provided in any of those works.

The usual criterion for discrimination between positive and negative results is based on the definition of a maximum value for the Ct (cycle threshold) necessary to amplify the viral RNA in the sample up to a detectable level. Samples that become detectable with a Ct greater than a pre-determined cut-off value Ct are interpreted as negative since the detected fluorescence is likely to represent noise. The authors of Reference [5] report that, in their experiments, the Ct value in pooled samples is increased by a factor of 1.24 for each increase of dilution by a factor of 2. Other works also report experiments in which changes of the Ct value in pooled samples are observed [6,7]. Although the authors of Reference [6] advise the “need for careful experimental design” due to that effect, no explicit guidelines for adapting the detection procedures for pool testing are provided in any of those works.

The goal of this study was to propose a methodology to determine the maximum pool size and to adjust cut-off values of cycle threshold (Ct) in RT-qPCR pool testing in order to compensate for the dilution caused by pooling. This article is organized as follows: A procedure is presented for the estimation of a lower bound g for the amplification factor g , which is characteristic of each specific laboratory setting. Then, a formula for the cut-off value of cycle threshold to be applied in pooled samples, denoted by C_t , is developed as a function of the pool size N , of g , and of the cut-off value adopted

in individual testing, C_t . This formula gives the cut-off that would be necessary for detecting viral RNA, in a pool testing, in a sample situated in the edge of detectability of individual testing. As the value of C_t may become greater than the upper limit of the equipment detection range, CM , as the pool size grows, then an upper bound N for the pool size N is established, as a function of C_t , CM , and g , to guarantee that the sensibility of pool testing remains compatible with individual testing. The results of a calibration assay for the determination of g in the specific laboratory setting used in this study are presented, and the respective specific formulae for C_t and N are derived. Finally, the application of the overall procedure in the processing of pooled samples collected from patients that attended a public emergency care unit are discussed.

Materials and Methods

Ethical Approval

This study was conducted within the preliminary phase of the research project Evaluation of the COVID-19 Diagnosis in Patients with Flu-Like Syndromes Attended at the Specialized COVID-19 Centers in Belo Horizonte, MG, Brazil. The research was approved by the UFMG Ethics Committee, CAAE-35074720.3.0000.5149, 23 June 2020.

Amplification Factor Estimation

In RT-qPCR, the concentration P of viral RNA in an individual sample after C cycles of replication is given by:

$$P = P_0 \gamma^C \quad (1)$$

with P_0 representing the initial concentration before starting replication, and γ representing the amplification factor per cycle. Let C_t represent the number of cycles that amplifies P up to the detection threshold. If the positive sample is diluted in a pool with $(N-1)$ negative samples, there will be a reduction of the initial viral concentration by a factor N . Therefore, the increase in the number of cycles for reaching detection in a pool is given by:

$$\Delta = C_t^* - C_t = \frac{\ln N}{\ln \gamma} \quad (2)$$

with C_t^* representing the number of cycles needed to reach the detection threshold in pool testing. For a given γ , different pool sizes lead to different Δ increments. For a specific set of reagents and PCR instrument, an explicit formula for the amplification factor γ can be stated:

$$\gamma = N^{\frac{1}{\Delta}} \quad (3)$$

The apparent value of parameter γ will vary between different runs, in the same equipment, due to random differences in relative volumes of reagent and sample material, and in relative volumes of different samples in a pool. The least reasonable value of γ should be employed in Equation (2), such that the relaxation Δ becomes greater than the expected empirical values of C_t^* found in practice.

Cut-Off Adaptation for Pooled Samples

Let C_t denote the cut-off value adopted in individual sample testing (any C_t value above it is assumed to indicate non-detection). The cut-off value C_t^* for pooled samples that allows the detection of samples that are on the edge of detection in individual testing, with $C_t = \bar{C}_t$, should be:

$$\bar{C}_t^* = \bar{C}_t + \frac{\ln(N)}{\ln(\bar{\gamma})} \quad (4)$$

Pool Size Upper Band

Each laboratory setting detection range which is bounded by a maximum detectable C_t value, denoted as C_M , needs to be determined. Using cut-off values above this limit would lead to false-positive results. Therefore, if the testing is expected to detect viral RNA in samples with C_t up to C_t , the pool size N must be chosen such that $C_t^* \leq C_M$, which establishes an upper bound N for the pool size that can be used:

$$N \leq \bar{N} = \exp[(C_M - \bar{C}_t) \ln(\bar{\gamma})] \quad (5)$$

Assuming that C_M and γ are fixed values, intrinsic to the specific laboratory setting, Equation (5) quantifies the trade-off between the maximum pool size N and the target detection threshold C_t . A stringent requirement on the detection of samples with high C_t is translated in high C_t values, leading to small pools. As that requirement is relaxed to smaller values of C_t , larger pool sizes become admissible, at the cost of possibly not detecting samples with C_t greater than C_t .

RT-qPCR Testing Framework

All testing experiments reported here were conducted in the CT-Vacinas laboratory according to the following guidelines. RT-qPCR tests for SARS-CoV-2 were performed with RNA purified from nasopharyngeal swab samples. RNA was extracted from 140 μ L of samples using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to protocols provided by the manufacturer. RT-qPCR was performed using primers and probes described in the Berlin (Charité/Berlin, Germany) protocol [8], targeting the gene E from SARS-CoV-2 and the human RNase P mRNA, used as endogenous amplification reaction control. Reactions were carried out with the Promega GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR Kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to manufacturer's recommendations, and the QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). To determine the lower limit of detection, the primer-probe sets were tested using purified SARS-CoV-2 RNA diluted in RNA elution buffer. The samples were assigned as undetectable when no SARS-CoV-2 gene E amplification occurs or a C_t value above 37 in individual tests was obtained. Pool samples were prepared by mixing individual samples to a final volume of 140 μ L before RNA extraction.

Calibration Experiments

The calibration phase of this study was performed using samples that were collected from patients with severe symptoms, which were processed individually. To determine a lower bound for γ in the specific setting used in this study, 14 samples with known Ct values were diluted in pools of sizes 16 and 32, and Formula (3) was employed in each case. The resulting values of γ were adjusted by a lognormal distribution. The value $\gamma = 1.46$ corresponds to the 90% percentile of that distribution, meaning that $\Pr(\gamma \geq \gamma) = 0.9$.

The variability of the apparent values between different executions of the testing procedure in the same experimental apparatus depends on several factors, such as the accuracy of the volume measurements made during the preparation of the pools. Although this study did not examine variations considering different experimental settings, it is reasonable to expect that the use of different reagents, for example, will also cause differences. For this reason, it is recommended that each laboratory that uses the procedures proposed in this article carry out a calibration test similar to the one described here. Notice that the calibration assay is quite simple, typically requiring only one batch run of the PCR system with 10 to 20 pooled volumes, which can be performed within a few hours.

Cut-Off Adjustment and Pool Size Choice

In the testing procedures adopted in this study, a range of different target cut-off values for individual samples was examined, with Ct varying from $\overline{Ct}_{min} = 33$ to $\overline{Ct}_{max} = 37$ respectively, leading to the following range of instances of Equation (4) for cut-off values to be adopted as functions of the pool size N:

$$\begin{aligned}\overline{C}_{tmin}^* &= 33 + 2.643 \ln(N) \\ \overline{C}_{tmax}^* &= 37 + 2.643 \ln(N)\end{aligned}\quad (6)$$

Those different target values mean that \overline{C}_{tmax}^* should be used whenever the detection of samples with individual Ct up to 37 is considered relevant, while \overline{C}_{tmin}^* may be used if not detecting samples with individual Ct above 33 is assumed to be admissible.

In the case of the laboratory setting employed in this study, the upper limit of the detection range is $CM = 41$. The following upper bounds for the pool size, \overline{N}_{33} and \overline{N}_{37} , respectively corresponding to $\overline{Ct}_{min} = 33$ and $\overline{Ct}_{max} = 37$, are calculated from Equation (5):

$$\begin{aligned}\overline{N}_{33} &= 20.65 \\ \overline{N}_{37} &= 4.54\end{aligned}\quad (7)$$

Equations (6) and (7) represent the guiding information for the adaptation of testing procedures for pool testing. After choosing the target cut-off value for individual testing within the range $\overline{Ct}_{min} = 33$ to $\overline{Ct}_{max} = 37$, Equation (6) shows the correction to be performed in the pool cut-off value \overline{C}_{t}^* for discriminating between positive pools and negative ones. Equation (7) shows the respective upper bounds for the pool sizes that still allow the detection of pools containing one positive sample on the edge of detectability. Those relations are represented in Figure 1.

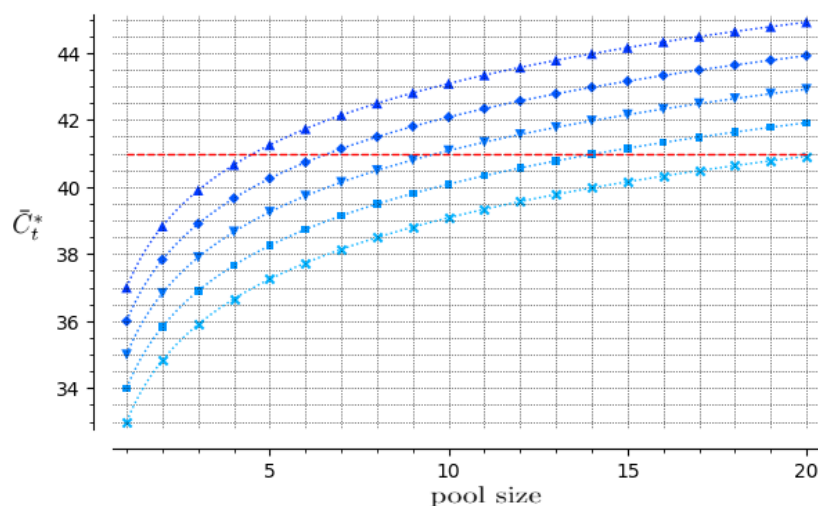


Figure 1. Cut-off values, C_t^* , that are to be employed in pool testing, as a function of pool size N , for individual test cut-off values $C_t = 33$ (x), $C_t = 34$ (□), $C_t = 35$ (V), $C_t = 36$ (◆), and $C_t = 37$ (▲). The maximal possible value for the adjusted cut-off in pool processing, $C_t^* = 41$, is represented by the horizontal dashed line. The maximum pool sizes are $N = 4$, for $C_t = 37$, and $N = 20$, for $C_t = 33$, both allowing $C_t^* < 41$.

Pool Testing for Patients with Mild Symptoms

From 9 September to 10 October 2020, adults attending a public emergency care unit, reference for COVID-19 in the city of Belo Horizonte, Brazil, and presenting flu-like symptoms were invited to participate. Those who agreed to participate ($n = 220$) signed an informed consent form, answered a questionnaire reporting clinical and socioeconomic aspects, and had nasopharyngeal swab material collected. The collected material was sent to CT-Vacinas for the execution of testing procedures.

The 220 samples were grouped into 40 pools, 23 of them were positive and 11 pools presented a single positive sample, corresponding to 50 patients. Those patients' age ranges from 20 to 88 years (40 16 years) and most of them were female (59%). Their symptoms had started from 1 to 15 days before the test (6 4 days) and half of them had no comorbidities. Individual C_t values ranged from 12.2 to 37.1, and 50% of the patients showed C_t values up to 20.0. The initial pool size of 12 was successively reduced to 8, 4, and 3 to adjust it to the disease prevalence measured during the initial phase of the study. It should be noticed that at the moment when this study started, there was no information about the prevalence of the disease among the population of Belo Horizonte. The initial pool size of 12 was chosen assuming a prevalence figure under 1%. However, the results soon revealed a prevalence between 15% and 25% of COVID-19 in the patients with flu-like symptoms that attended that care unit. This led to the resizing of pools to keep the optimum size from an economic point of view. It is important to stress that pooling was random, and positive samples were not purposely included in pools.

Results

Among 23 positive pools, 11 pools presented a single positive sample. The pools with more than one detectable sample were not included in this study, as they do not follow Equations (2) and (3), since those equations assume the worst case in which one positive sample is diluted such that the viral RNA concentration is decreased by a factor of $1/N$. Table 1 shows C_t values of those individual samples as well as C_t values obtained

with each pool and the recommended increase in cut-off value (see also Appendix A). A recommended increase in cut-off values relative to the RT-qPCR original cut-off is calculated in order to compensate dilution caused by pooling. This increase in Ct ranges from 6.6 in pools of 12 samples containing one positive sample, to 2.9 in pools with 3 samples containing one positive sample.

Table 1. Ct values in pools with a single positive sample and recommended increase in cut-off value.

Pool Size	C _t Value of Individual	C _t Values Obtained with Each Pool	Empirical Increase of C _t	Recommended Increase in Cut-Off Value: $(\frac{\ln(N)}{\ln(\gamma)})$
N	C _t	C _t *	Δ_e	
12	16.9	20.7	3.8	6.6
8	18.1	23.1	5.0	5.5
8	21.0	24.3	3.3	5.5
8	35.4	40.5	5.1	5.5
8	26.4	28.1	1.7	5.5
3	34.8	37.5	2.7	2.9
3	27.5	28.9	1.4	2.9
3	16.6	18.2	1.6	2.9
3	30.8	33.5	2.7	2.9
3	22.6	25.0	2.4	2.9
3	22.5	24.9	2.4	2.9

Note: 1 a single sample was positive in each analyzed pool.

Discussion

All empirical increases in Ct values, presented in Table 1, were smaller than the recommended increase in the cut-off. This outcome was expected since the adapted cut-off value was calculated from a lower bound estimate of the amplification factor γ . Notwithstanding, the excess of the recommended increase in relation to the empirical increase was relatively small in most cases. It should be noticed that, although it is expected that different experimental settings will not lead to recommended increases in cut-off values that are too different from the ones presented in Table 1, a prudent approach would be to carry out calibration experiments in each laboratory that would run pooled testing programs, at least until more data is available on the variation of the apparent amplification factor γ in different experimental contexts.

The proposed relaxation in cut-off is dependent on the pool size, allowing a relatively tight correction to avoid loss of detection of positive samples such as the ones presented in the 4th and 6th lines of Table 1. If the usual fixed cut-off Ct = 37 was employed in the pool processing, the pools containing those samples would have been considered negative. The proposed method also avoids excessively large corrections that could result in several false-positive pools.

The choice of a target cut-off Ct should be done based on an assessment of the risk of not detecting infective individuals as smaller values are adopted. A review article [9] asserts that an increasing body of evidence suggests that Ct values are useful proxies for infectivity and discusses some studies that attempted to cultivate the virus from

samples with different Ct values. Those studies have found that viral culture was largely unsuccessful when $Ct > 33$. Reference [10] reports an experiment with more than 3000 samples in which less than 3% of the ones with $Ct > 35$ presented virus that could be cultivated. Higher target values are more conservative: the value $Ct = 37$ has been used by CT-Vacinas laboratory in most of the individual tests that have been performed in the last months because it represents a good compromise between the objectives of detecting all infected individuals and avoiding false-positive results. In the case of pool testing, the choice of the target cut-off Ct causes a major impact in the cost-effectiveness outcomes, since different choices in the range 33–37 lead to maximum pool sizes that vary from 4 to 20, as shown in Equation (7) and Figure 1. A specific Ct value should be chosen according to the purpose of the testing procedure, which will determine the acceptable risk level.

As the cut-off value Ct^* to be adopted in a pool testing is increased in relation to the individual testing cut-off Ct, it should be expected that the rate of false-positive results in pool testing also increases. In fact, among the pools that were processed in this study, there was one pool of size $N = 3$ which presented a positive result with $Ct^* = 38.7$, although the individual testing of all samples resulted negative. This event illustrates an important property of the proposed methodology: there is no increment in false-positive results in relation to individual testing, due to the final phase of individual testing of all samples whenever a pool is found to be positive.

It is worthy to comment that the optimal pool sizes, under the viewpoint of cost optimization, will depend on the prevalence of the disease in the population under study. As shown in Reference [11], the optimal pool sizes may vary from 12, for prevalence under 1%, to 3, for prevalence between 13% and 30%. For prevalence of 1%, the expected savings are nearly 80%, while in the case of prevalence of 13%, the expected resource savings are nearly 33%. For a prevalence of 30%, the expected savings are only about 1%, which means that the pool testing technique no longer presents an advantage. In the case of the study reported here, the weekly prevalence varied between 15% and 25%, leading to overall cost savings of approximately 15%.

In summary, the following procedure for the adaptation of Ct cut-off value for SARS-CoV-2 detection in pools and for choosing the maximum admissible pool size is proposed here:

Find an estimate of lower bound for the amplification factor value corresponding to the laboratory setting to be used, by a calibration assay that compares Ct of individual and pooled samples, using Equation (3) and a lognormal parametric model of probability distribution.

For each pool size, calculate the corresponding correction of cut-off value, according to Equation (4).

Considering the equipment detection range and the desired target cut-off for individual testing, employ Equation (5) for finding the maximal admissible pool size.

If the optimal pool size under the economic viewpoint, as stated in Reference [11], is greater than that maximal admissible pool size, adopt that maximal value; otherwise, employ the optimal size.

The proposed procedure enhances the consistency of RT-qPCR pool testing by enforcing that the scales of detectability in pool processing and in individual sample processing are compatible. This procedure may contribute to reduce false-negative results in RT-qPCR pool testing, enhancing its contribution to large-scale testing for COVID-19.

Funding: This work was funded by Secretaria de Ensino Superior do Ministério da Educação (grant number SEI 23072.211119/2020-10), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (PhD scholarship to M.S.C.). The work was also funded by Rede-Virus, an initiative of the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI).

Institutional Review Board Statement: The research was approved by the UFMG Ethics Committee, CAAE-35074720.3.0000.5149.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All data will be publicly available.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Cherif, A.; Grobe, N.; Wang, X.; Kotanko, P. Simulation of pool testing to identify patients with Coronavirus Disease 2019 under conditions of limited test availability. *JAMA Netw. Open* 2020, 3, e2013075.
- Mallapaty, S. The mathematical strategy that could transform coronavirus testing. *Nature* 2020, 583, 504–505.
- Kim, S.Y.; Lee, J.; Sung, H.; Lee, H.; Han, M.G.; Yoo, C.K.; Lee, S.W.; Hong, K.H. Pooling upper respiratory specimens for rapid mass screening of COVID-19 by real-time RT-PCR. *Emerg Infect. Dis.* 2020, 26, 2469–2472.
- Torres, I.; Albert, E.; Navarro, D. Pooling of nasopharyngeal swab specimens for SARS-CoV-2 detection by RT-PCR. *J. Med. Virol.* 2020, 92, 2306–2307.
- Yelin, I.; Aharony, N.; Tamar, E.S.; Argoetti, A.; Messer, E.; Berenbaum, D.; Shafran, E.; Kuzli, A.; Gandali, N.; Shkedi, O.; et al. Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi sample pools. *Clin. Infect. Dis.* 2020, 71, 2073–2078.
- Clark, A.E.; Lee, F.M. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Screening with Specimen Pools: Time to Swim, or Too Deep for Comfort? *Clin. Infect. Dis.* 2020.
- Mutesa, L.; Ndishimye, P.; Butera, Y.; Souopgui, J.; Uwineza, A.; Rutayisire, R.; Ndoricimpaye, E.L.; Musoni, E.; Rujeni, N.; Nyatanyi, T.; et al. A pooled testing strategy for identifying SARS-CoV-2 at low prevalence. *Nature* 2020, 589, 276–280.

Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.W.; Bleiker, T.; Brunink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro. Surveill.* 2020, 25, 1–8.

Rhee, C.; Kanjilal, S.; Baker, M.; Klompas, M. Duration of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infectivity: When Is It Safe to Discontinue Isolation? *Clin. Infect. Dis.* 2020.

Jaafar, R.; Aherfi, S.; Wurtz, N.; Grimaldier, C.; Hoang, V.T.; Colson, P.; Raoult, D.; Scola, B.L. Correlation between 3790 quantitative polymerase chain reaction–positives samples and positive cell cultures, including 1941 severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolates. *Clin. Infect. Dis.* 2020.

Dorfman, R. The detection of defective members of large populations. *Ann. Math. Stat.* 1943, 14, 436–44.

APÊNDICE D

Description of RT-qPCR in pooled samples (pool testing) for diagnosis of COVID-19

Description of pool testing for diagnosis of COVID-19

Hugo Itaru Sato¹, Murilo Soares Costa², Ricardo Hiroshi Caldeira Takahashi³, Karine Lima Lourenço¹, Nathalia Sernizon Guimarães⁴, Claudia Regina Lindgren Alves⁵, Elaine Leandro Machado⁶, Unai Tupinambás^{2,7}, Flávio Guimarães da Fonseca¹, Santuza Maria Ribeiro Teixeira¹

¹Centro de Tecnologia de Vacinas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

²Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

³Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Matemática, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

⁴Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

⁵Faculdade de Medicina. Departamento de Pediatria, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

⁶Faculdade de Medicina. Departamento de Medicina Preventiva e Social, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

⁷Faculdade de Medicina. Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

Corresponding author:

Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Rua Professor José Vieira de Mendonça, 770 - Sala 206 - Engenho Nogueira, Belo Horizonte - MG, 31310-260.

Phone: +55 (31) 3401-1113

E-mail: santuzat@ufmg.br

ABSTRACT

The large-scale testing strategy aims at the early diagnosis of COVID-19 in the greatest number of individuals, helping to understand the health scenario. Pool testing is a testing strategy that performs the analysis of pooled samples. The aim of this study is to describe the reverse transcription technique followed by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) using pool testing to detect SARS-CoV-2 in a nasopharyngeal swab sample. The study describes an innovative diagnostic strategy that contributes to the optimization of inputs, cost reduction and greater agility in the feedback of results.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; Pandemics; Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; Diagnosis

INTRODUCTION

The reverse transcription technique followed by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), indicated to be performed within 3 to 5 days of the onset of signs and/or symptoms, or suspicion of contagion, is the main confirmatory test to diagnose COVID-19, a disease caused by the new coronavirus^{1,2}. Despite this, this test has several limitations for use in low and middle-income countries, such as the high technical complexity that requires an infrastructure with an adequate level of biosafety and the high cost of equipment and supplies. These limitations can make it difficult to access timely diagnosis of symptomatic cases as well as asymptomatic cases, thus being a major challenge for coping with the pandemic.

Pool testing is the strategy for grouping samples to perform laboratory tests. After collecting the samples individually, they are pooled in the laboratory for processing and analysis. If the result of the RT-qPCR test performed with the sample pool is positive, the analysis is repeated with the individual samples to identify which samples have detectable viral RNA levels in that pool. If the pool result is negative, all samples are considered to have undetectable levels of viral RNA¹. The pool testing strategy was developed by Dorfman to detect syphilis in soldiers in World War II³. The pooled testing method is a strategy capable of increasing population testing, optimizing resources and reducing laboratory costs, helping to understand the epidemiological picture and adopting measures to reduce the circulation and transmission of infectious agents, as well as control the emergence of outbreaks, thus contributing to the fight against epidemics¹.

Several studies show that large-scale continuous testing, aiming at the early diagnosis of COVID-19, is one of the central strategies in epidemiological surveillance,

contributing decisively to assess the evolution of the pandemic, the incidence rate, mortality, transmissibility, lethality, in addition to identification of suspected cases⁴. In view of the difficulties in controlling the COVID-19 pandemic and the high cost of carrying out RT-qPCR tests in Brazil, the objective is to describe the performance of RT-qPCR through pool testing for the detection of SARS-CoV-2 performed at CT-Vacinas/UFMG in partnership with the UPA Centro-Sul from Belo Horizonte, Minas Gerais. The successful implementation of the method serves as a model of employment for many other pathologies and epidemic situations.

POOL TESTING DESCRIPTION

The procedure for collecting nasopharyngeal swabs from suspected cases of SARS-CoV-2 infection was performed by suitably trained professionals. Then, each patient's swab was immersed in a tube containing 1 mL of viral inactivation and transport solution⁵ and the same proceeded for processing and analysis in the laboratory within 18 hours.

Within a laboratory structure with an adequate biosafety level, a previously trained technician prepared the pools to perform the RT-qPCR, which consisted of adding 50 microliters of each sample in 1.5 mL microtubes. The rest of the sample was properly stored for further analysis or not, depending on the result of the pooled test. The number of samples per pool was determined by estimating the prevalence of COVID-19 in the study population, ranging from 3 to 16 samples per pool. After homogenization, the process of RNA extraction and RT-qPCR occurs normally, as if it were performed on a single sample, taking into account that the maximum volume of sample to be processed using an RNA extraction column is 140 microliters.

For RNA extraction and purification, the protocol described in the “QIAamp Viral RNA Mini Kit” kit from QIAGEN (Germany) was used. After cDNA synthesis, PCRs were performed with a probe for the endogenous human RNase P gene and the gene (E) that encodes the viral envelope, using the QuantStudio 5 real-time thermocycler, following the protocol by Charité⁶.

In cases where the result of the pool was detectable for viral RNA, individual processing of the samples present in that group was performed, using 140 microliters to extract the RNA from each sample. When the pool result was undetectable, it was interpreted as follows: all samples present in the pool were considered to have a non-detectable result for viral RNA and, therefore, it was not necessary to test them individually as shown in Figure 1. In pools with inconclusive results due to the absence of endogenous gene amplification, pool reassembly was necessary. For results with a small amount of initial viral RNA, with Ct values close to the detection threshold of the method (the detection limit or cut-off point or cut-off may vary according to the kits of supplies used in each laboratory, due to differences such as enzymatic efficiency, yield and quality of the extracted RNA) individual processing of those samples that made up the given pool was performed. The test cut-off points were defined as previously determined⁷. After analyzing the results, the samples were stored at -80°C in the inactivation and transport solution. The purified RNA samples were also stored in ultrafreezers at -80°C.

Obtaining and releasing the results was carried out within a maximum of 72 hours after the samples arrived at the laboratory. Figure 1 presents the strategy for performing RT-qPCR in pooled testing.

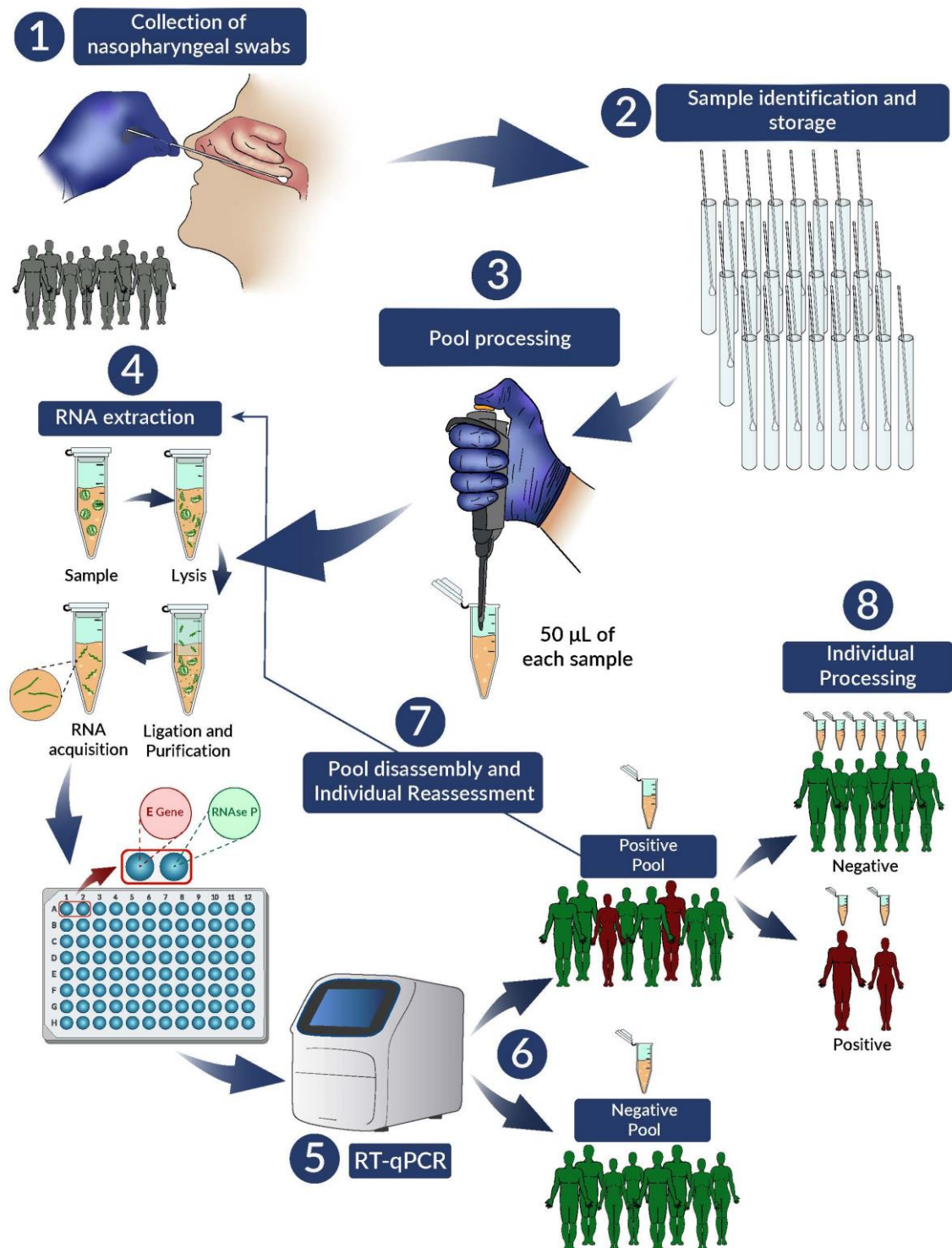


Figure 1 - Strategy for performing RT-qPCR in pooled testing

DISCUSSION

The timely diagnosis of COVID-19 cases is one of the most important tools for dealing with the pandemic and must be carried out in every suspected case, even with the expansion of vaccination of the population around the world. Early diagnosis is an important tool for epidemiological surveillance and for stopping the spread of the virus through the adoption of social distancing and isolation strategies after a detectable result².

It is suggested that the strategy of mass testing through pool testing can be adopted as a public health measure with the help of central, regional, municipal or supplementary health laboratories. This suggestion is justified by the observation of the optimization of resources and inputs, through the result of undetectable pools when performing the grouping of samples (step 3 - Figure 1), according to the size of the pool and the continuation of the RT-qPCR technique as if it were a single sample (step 4 and 5 - Figure 1).

For assembling the pools, there are predictive mathematical models that are used as a basis for estimating the prevalence of the condition being investigated, adjusting the number of samples per group so that undetectable pools can occur (step 6 in Figure 1), since in populations where the prevalence of the investigated condition is low, it becomes possible to assemble a pool with a greater number of samples, and greater probability of resulting in undetectable while maintaining the sensibility to detect the viral RNA as previously seen by the characterization of pools and individual samples tested in other study⁷, consequently, generating savings that can be estimated in different scenarios accordingly to the number of positive pools⁸, optimizing resources and expanding access to the diagnostic test¹.

Applying this testing model to the Brazilian reality and developing countries, the pooled testing strategy is suggested as a viable alternative that must be widespread and disseminated, since we do not produce reagents to perform RT-qPCR and we depend mostly on the importation of these inputs, which explains the high cost per test performed. In addition, at various times of the pandemic there was a shortage of supply of these inputs.

CONCLUSION

With the description of pool testing, the optimization of laboratory supplies was demonstrated, causing a decrease in total costs, in addition to expanding the offer of the exam to more people. This testing strategy can be used in the return of face-to-face teaching, in addition to periodic surveillance for health professionals and other more vulnerable scenarios, for example long-stay institutions for the elderly and other key populations. When considering the COVID-19 pandemic as one of the greatest public health challenges ever faced, all effective and evidence-based measures must be analyzed to support health surveillance actions for the detection and control of the disease. Finally, the strategy can and should be expanded to the diagnosis of other diseases, especially in epidemic situations with a high demand for testing.

REFERENCES

1. Mallapaty S. The mathematical strategy that could transform coronavirus testing. *Nature*. 2020;583(7817), 504–505. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02053-6>

2. World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard; 2021 [citado 22 jun 2021]. Disponível em: <https://www.https://covid19.who.int/>
3. Dorfman R. The Detection of Defective Members of Large Populations. *Ann Math Stat.* 1943;14(4):436–40. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177731363>
4. Peto J. Covid-19 mass testing facilities could end the epidemic rapidly. *BMJ (Clinical research ed.)*, 2021; 368, m1163. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1163>
5. Carvalho, A.F., Rocha, R.P., Gonçalves, A.P. *et al.* The use of denaturing solution as collection and transport media to improve SARS-CoV-2 RNA detection and reduce infection of laboratory personnel. *Braz J Microbiol.* 2021; 52, 531–539 . <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00469-4>
6. Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.W.; Bleiker, T.; Brunink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro. Surveill.* 2020; 25, 1–8. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
7. Costa, M. S., Sato, H. I., Rocha, R. P., Carvalho, A. F., Guimarães, N. S., Machado, E. L., Alves, C., Teixeira, S., Takahashi, R., Tupinambás, U., & da Fonseca, F. G. . Adjusting the Cut-Off and Maximum Pool Size in RT-qPCR Pool Testing for SARS-CoV-2. *Viruses*, 2021; 13(4), 557. <https://doi.org/10.3390/v13040557>
8. Guimarães, N. S., Costa, M. S., Machado, E. L., Sato, H. I., Amaral, E. C. M., Arivabene, R. G., Lourenço, K. L., Tupinambás, U., da Fonseca, F. G., Takahashi, R., Teixeira, S., & Alves, C. R. L. Self-collected nasopharyngeal swab and molecular test using pool testing as strategies to detect severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): feasibility in medical students at the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, 2021. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 2022; 31(1), e2021409. <https://doi.org/10.1590/S1679-49742022000100002>

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

APÊNDICE E

COVID-19 reinfection between doses of vaccination: Case Report

Murilo Soares Costa¹, Gabriel de Oliveira Gelape², André Barbosa de Andrade², Luiza Passini Vaz-Tostes², Madara da Silva Simões², Rhuan Braga Oliveira², Nathalia Sernizon Guimarães³, Unaí Tupinambás^{1,4}

1. Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

2. Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

3. Escola de Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

4. Faculdade de Medicina. Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Autor correspondente: Murilo Soares Costa – E-mail: murilosoasta@gmail.com

ABSTRACT

Context: Vaccination against COVID-19 is happening worldwide, with most vaccines requiring 2 doses to reach its maximum potential. It is the most efficient measure to prevent new cases of COVID-19, both of infection and reinfection. **Case report:** This case reports the reinfection of a female receptionist at an urgent care facility, where the research group was testing and monitoring symptoms of patients with flu syndrome, in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, where she reinfected between the two preconized doses. Her initial infection occurred in September 2020 and reinfection in February 2021, 14 days after the first dose - both confirmed by RT-PCR - with reportedly worse symptoms on the latter. **Discussion:** Cases of reinfection can occur, especially with the presence of new strains. **Conclusions:** We warn for the possibility of reinfection episodes even after the first dose of vaccination, differently from what literature stated so far, so that health agents can organize more effective security measures, in a context of viral mutation and of new strains.

Keywords: Reinfection, vaccination, COVID-19

INTRODUCTION

Vaccination against the new coronavirus was first instituted on front-line workers to prevent these individuals from getting infected and to avoid mortality and morbidity, even in those who had already been infected. Though the results of efficacy are promising, the current status of the vaccination process does not imply complete and long-lasting immunity or safety, only after mass vaccination the extent and the possible late adverse reactions will be elucidated.¹⁻²

Therefore public authorities and the scientific community must play a fundamental role by reporting reinfection cases and adverse reactions to the vaccine, which will be helpful to elucidate for how long might a first infection protect from a second one, which are the most common adverse reactions and how safe and effective are the vaccines in a context of viral mutation.³⁻⁵

Our case reports on a Brazilian receptionist working in the front-line of a coronavirus disease 2019 (COVID-19) urgent care facility, who was reinfected with the SARS-CoV-2 virus soon after vaccination. She was tested with Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in both occasions, being retested in the second, confirming the reinfection.

CASE REPORT

Female patient, 31 years old, front-line health care worker in an urgency unit in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. First, she presented headache and myalgia on September, 8th, 2020. On the following day, she was tested with RT-PCR and positives for COVID-19. Acetaminophen, metoclopramide and loratadine were prescribed for treatment of her symptoms and she was discharged from the unit to finish recovery isolated at home. During the following week she presented full improvement at home, without further need of hospitalization.

On January, 27th, 2021 she was vaccinated with the first dose and, 14 days later, on February, 10th, 2021 she was vaccinated with the second dose while still working on the same unit. In the following day of the second dose she developed mild myalgia, sore throat, nuchalgia, ventilatory dependent thoracic pain, dry cough and a burning pain in the back, when she sought medical care. It was sorted as a possible COVID-19 case in the care unit and, again, she was tested, oriented and treated for her symptoms. During this second infection her headache became worse and she developed nasal congestion that improved in the following days. Five days after her first test, she was (re-)tested by our research group that pool-tested her sample, confirming the infection. Her doctor also suspected of an allergic response to the vaccine. In the meantime of this infection she was also treating an urinary infection. She had no prior history of any risk condition. In neither occasion she presented shortness of breath, desaturation, tachycardia or alteration of vital signs that required specialized attention.

TABLE 1 - Infection information

	1nd infection	2nd infection
Date	Set 8th 2020	Feb 11th 2021
Symptoms	Headache and myalgia	Mild myalgia, sore throat, nuchalgia, thoracic pain, dry cough and nasal congestion
RT-PCR	Set 9th 2020	Feb 12th 2021

Case Overview

DISCUSSION

As in every new disease that is yet under study, uncertainty of data is a big challenge. The decrease of antibodies after the infection have been pointed out,⁶ but its response to a second contact is yet to be fully elucidated. With new virus strains occurring worldwide, specifically in Brazil, where the sequencing of altered strains is proving that new strains are becoming more frequent in the country,⁷ this immunological response is even more unclear, since the transmissibility of the virus itself is altering.

Brazil's COVID-19 infectivity pattern is changing from the first wave and it seems that new strains identified in the United Kingdom (B.1.1.7), South Africa (B.1.351), Manaus - Brazil (P.1) and Rio de Janeiro - Brazil (P.2) are circulating in the country and are involved in these changes. All of them are related to a quicker expansion and afflict especially younger individuals and women, and could have an association with a greater virulency.⁸ Epidemiologically speaking, our patient's reinfection can be related with new strains.

The possibility of a common adverse reaction to the vaccine was ruled out because they are, in order of most to less common: pain in the vaccination spot, headache and fatigue (especially after the second dose).⁹ In her case, she developed all these symptoms, and also important thoracic pain, dyspnea and nasal congestion, which alone could not be explained simply by an adverse reaction to the vaccine's second dose.

It was observed that individuals SARS-CoV-2-naive had an increase in antibody titers in both doses of vaccination, while SARS-CoV-2-experienced individuals had a stronger response to the first dose, rather than to the following second dose suggesting, by yet uncertain mechanisms, that one dose alone might provide the necessary protection.¹⁰ In the case studied, even though the receptionist was SARS-CoV-2-experienced (with more than 90 days from the first viral contact) and had already taken her first dose of the two preconized in Brazil's Vaccination Program, she was reinfected, evolving with worse symptoms than she presented in the first infection, which has been seen in cases of reinfection in Brazil, and other parts of the world such as United States and Ecuador.¹¹

We must still be cautious about the impacts of vaccination. Though vaccines will have a great impact on mortality and morbidity, new strains are showing greater infectivity, resulting in poorer efficacy results in some vaccines, and the extent of this protection is still to be fully assessed¹¹. Progress on research with genome sequencing and understanding the population's immunological status will have a huge impact in the safety of front-line professionals. Still, if vaccinated, one must keep all safety protocols to avoid spreading the virus. Meanwhile, it is most appropriate to vaccinate as many people possible in the shortest period of time, to restrict the circulation of the virus, stop the occurrence of more variants and prevent new infections or reinfections, which must be diagnosed through RT-PCR and, if possible, genetic sequencing. It is important to detect these possible reinfections, adverse reactions and new manifestations. Test people with signs and symptoms and report these cases are of great importance and strategies such as pool-testing may help in scenarios of limited resources,¹² such as the one Brazil currently faces, when crucial information may be missed if not tested or accessed.

CONCLUSION

Cases of infection and reinfection of COVID-19 may occur after vaccination. Suspected cases, even after the vaccine, should collect a nasopharyngeal swab sample to investigate SARS-CoV-2 using RT-PCR. Suspected and confirmed cases must be reported to proper authority in order to have better understanding and allow development in the field of research, based on trustable data. One strategy for taking the exam, and allow more people to be able to test, is through pool testing. The need to perform this test in people vaccinated with suspicious signs and symptoms is due to the circulation of variants occurring worldwide. While Brazil is still vulnerable to constant mutations, efforts must be made to better understand these events.

REFERENCES

1. Krause PR, Gruber MF. Emergency Use Authorization of Covid Vaccines - Safety and Efficacy Follow-up Considerations. *N Engl J Med.* 2020;383(19):e107. PMID: 33064383; <https://doi.org/10.1056/NEJMp2031373>.
2. Kochhar S, Salmon DA. Planning for COVID-19 vaccines safety surveillance. *Vaccine.* 2020;38(40):6194–8. PMID: 32684499; <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.07.013>.
3. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med.* 2020;383(18):1724–34. PMID: [PMC7494247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33064383/); <https://doi/10.1056/NEJMoa2026116>.
4. Widge AT, Roupael NG, Jackson LA, et al. Durability of Responses after SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccination. *N Engl J Med.* 2021;384(1):80–2. PMID: [PMC7727324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33064383/); <https://doi/10.1056/NEJMc2032195>.
5. Ribas Freitas AR, Giovanetti M, Alcantara LCJ. Variantes emergentes do SARS-CoV-2 e suas implicações na saúde coletiva. *InterAm J Med Health.* 2021; 4. <https://doi.org/10.31005/iajmh.v4i.181>.
6. Seow J, Graham C, Merrick B, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol.* 2020;5(12):1598–1607. PMID: **33106674**; <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00813-8>.
7. Buss LF, Prete CA, Abraham CM, et al. Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science.* 2021;371(6526):288-92. PMID: [PMC7857406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33064383/); <https://doi.org/10.1126/science.abe9728>.
8. Freitas ARR, Beckedorff OA, de Góes Cavalcanti LP, et al. A emergência da nova variante P. 1 do SARS-CoV-2 no Amazonas (Brasil) foi temporalmente associada a uma mudança no perfil da mortalidade devido a COVID-19, segundo sexo e idade. *SciELO PrePrint.* 2021. <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.2030>.

9. Zhang Y, Zeng G, Pan H, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(2): 181–92. PMID: [PMC7561304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33797393/); [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30831-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30831-8).

10. Samanovic MI, Cornelius AR, Wilson JP, et al. Poor antigen-specific responses to the second BNT162b2 mRNA vaccine dose in SARS-CoV-2-experienced individuals. *medRxiv.* 2021. PMID: [PMC7885942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33797393/); <https://doi.org/10.1101/2021.02.07.21251311>.

11. Fintelman-Rodrigues N, da Silva AP, Dos Santos MC, et al. Genetic Evidence and Host Immune Response in Persons Reinfected with SARS-CoV-2, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27(5):1446-53. PMID: **33797393**; <https://doi.org/10.3201/eid2705.204912>.

12. Costa MS, Sato HI, Rocha RP, et al. Adjusting the Cut-Off and Maximum Pool Size in RT-qPCR Pool Testing for SARS-CoV-2. *Viruses.* 2021;13(4): 557. PMID: [PMC8066647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33797393/); <https://doi.org/10.3390/v13040557>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the reinfected patient with COVID-19 who agreed to help and to participate and be retested in difficult circumstances. Also to all the front-line workers who daily risk their life to help those in need in times when the numbers of cases are continually growing in Brazil. Last, we acknowledge the scientists that help in the laboratories, professionals in the UPA-Centro Sul and the researchers of Universidade Federal de Minas Gerais working at CT-Vacinas.

FINANCIAL SUPPORT

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - PhD scholarship

CONFLICT OF INTEREST

The research group denies any conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

The research was approved by the UFMG Ethics Committee, CAAE-35074720.3.0000.5149.

APÊNDICE F

Face mask use and viral load in patients with mild symptoms of COVID-19

Murilo S. Costa, Claudia R.L. Alves, Flávio G. Fonseca, Hugo I. Sato, Raissa P. Rocha, Alex F. Carvalho, Karine L. Lourenço, Nathalia S. Guimarães, Elaine L. Machado, Santuza M.R. Teixeira, Unai Tupinmabás, Ricardo H.C. Takahashi

ABSTRACT

Objective: Former studies indicated that face masks reduce the probability of infection by SARS-CoV-2, but didn't examine the relationship between infection viral load and mask usage. This study analyses this relationship.

Methods: This cross-sectional study included 442 adults with mild symptoms diagnosed with COVID-19 by RT-PCR, among which 118 individuals were tested until 3rd day after symptom onset. Participants were interviewed about mask usage and had oropharyngeal swab collected, with viral load measured by RT-PCR. The difference between the rates of high viral load infections in groups of individuals using and not using masks was submitted to a hypothesis test.

Results: 72.7% of the patients not using masks and 50% of the patients using masks presented high viral load, for tests until 3rd day after symptom onset. This difference was statistically significant (p-value 0.0154).

Conclusion: Mask usage is correlated with a relevant reduction in the viral load of SARS-CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2; face masks; viral load; respiratory protective devices; airborne infectious diseases

Introduction

SARS-CoV-2 is a virus that invades the human body mainly through the respiratory tract, causing COVID-19¹. Shortly after the pandemic was declared, a global discussion about prevention with non-pharmaceutical measures was raised. Among these, the use of face masks by the general population stood out due to its known effectiveness in preventing airborne infectious diseases^{2,3}.

As pointed out by Howard et al.⁴, logistical and ethical reasons preclude conducting randomized controlled trials to assess the effectiveness of masks in reducing community transmission of COVID-19. Therefore, other kinds of evidence should be sought. Laboratory studies showed that surgical face masks significantly reduce the emission of SARS-CoV-2 viral particles by infected individuals, both in droplets and in aerosols⁵, and that consumer-grade face masks have filtering efficiency like medical procedure masks⁶. Other studies examined the incidence of COVID-19 in populations,

seeking to correlate it to adherence to mask use^{7,8,9}, and concluded that masks significantly reduce disease transmission.

Two observational studies analyzed the effectiveness of masks in COVID-19 prevention. Secondary disease transmission in households was examined in 124 families with at least one confirmed case of COVID-19 in Beijing, China¹⁰. It was observed that face masks were 79% effective in preventing contamination. In Hiroshima, Japan¹¹, 820 close contacts of individuals diagnosed with COVID-19 were examined, with 16.4% of those not wearing masks infected, against 7.1% of mask users.

The present study aims to analyze the association between face mask usage and the viral load in patients with COVID-19, confirmed by RT-PCR. To our knowledge, no similar studies have been published.

Materials and Methods

This cross-sectional study evaluated patients admitted at a public Emergency Care Unit (ECU) in Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil), between October 2020 and March 2021. During this period, Belo Horizonte recorded the two highest peaks in the number of cases of COVID-19 observed so far, in early January and in March.

The present study is part of a large research, approved by the Universidade Federal de Minas Gerais Committee. All patients who accepted to participate voluntarily in the research signed a free and informed consent form.

The convenience sample was recruited at the ECU during the period of the study. Adult patients with COVID-19 symptoms were invited to participate after being examined by a physician, following the ECU routine. A total of 1,358 patients were eligible for the large study. The 442 who had RT-PCR detectable for SARS-CoV-2 were included in the present analysis. Participants were interviewed regarding sociodemographic aspects, clinical manifestations, such as the number of days from the onset of the symptoms, and adherence to COVID-19 prevention measures, including the use of face masks.

The number of days from the onset of the symptoms were categorized into up to three days and four days or more. The variable “use of mask” was obtained by asking: *When you leave home, do you wear a mask covering your mouth and nose?* The answer options could be: (i) every time, (ii) most of the time, (iii) sometimes, (iv) rarely, or (v) never. Participants that answered (i) or (ii) were classified as “regular use of mask” (RM), and the ones that answered (iii), (iv), or (v) were classified as “not regular use of mask” (NM).

The presence of SARS-CoV-2 RNA was tested by RT-PCR (pool testing) in nasopharyngeal swab samples of all eligible participants. As described by Costa et al.¹², if the pool was positive, the samples were analyzed individually to determine which ones were positive and measure their cycle threshold (Ct). Patients who tested positive were classified in high (Ct < 20) and non-high ($20 \leq Ct \leq 37$) viral load groups. Patients with Ct greater than 37 were considered negative for SARS-CoV-2. It should be noticed that the viral load is a continuous quantity, and there is no report of the existence of any turning

point which indicates a sudden change on the clinical condition of the patient when the Ct value goes under that value. Therefore, the choice of a boundary between the Ct values that indicate high viral load and non-high viral load is in part arbitrary. The threshold Ct=20 was chosen because this is the smallest integer value which keeps one third of the participants in the category of high viral load.

Data were entered by two researchers using Microsoft Excel®. Two other researchers undertook a consistency assessment to ensure data authenticity and reliability. Data analysis was performed using the Matlab Statistics and Machine Learning Toolbox from Matlab® R2021a. Hypothesis tests assuming binomial distribution of the event “high viral load” and significance level $\alpha=0.05$ were performed to assess the statistical significance of the difference between the proportions of high viral load infections observed in RM and NM patients with up to 3 days of symptom onset and 4 days or more. The analysis was performed assuming independence between the outcomes from different patients. The supplemental material to this paper describes the hypothesis test that was performed. Confidence intervals were also determined assuming binomial distributions.

Results

Among the 442 RT-PCR positive patients, 55% were female, 70% declared themselves black or brown, and 41% were aged between 30 and 49 years (ages ranged from 18 to 90 years). Table 1 shows the description of the sample considering face mask usage, onset of the symptoms, and viral load. 350 patients (79.2%) reported regular usage of face masks, while 92 (20.8%) reported not using mask regularly. 118 patients (26.7%) were tested until the 3rd day after symptom onset, and 324 (73.3%) were tested after a larger time interval. Assuming that a high viral load is characterized by Ct < 20, 166 patients (37.6%) were diagnosed with high viral load and 276 patients (62.4%) were diagnosed with non-high viral load.

Table 1. Number of patients that tested positive to SARS-CoV-2, for each combination of circumstances, and mean Ct value for each group of patients.

Interval to test	Until 3 rd day of symptom onset				From 4 th day of symptom onset			
	Regular		Not regular		Regular		Not regular	
Viral load	High	Not high	High	Not high	High	Not high	High	Not high
Number of patients	48 (50%)	48 (50%)	16 (72.7%)	6 (27.3%)	77 (30.3%)	177 (69.7%)	25 (35.7%)	45 (64.3%)
Mean Ct	16.5	25.5	16.9	26.5	17.0	26.7	17.7	27.0

Figure 1 shows the viral load versus the number of days from symptoms for each patient tested until ten days after symptom onset.

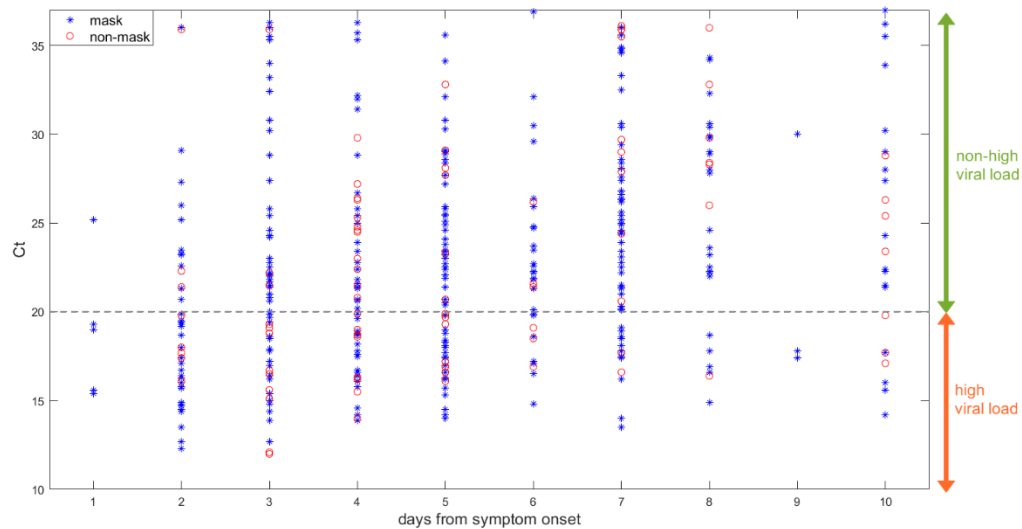


Figure 1. Viral load indicator (Ct) versus number of days from symptom onset for each patient that was tested until ten days after symptom onset. Higher Ct values indicate lower viral loads. The RM patients (that use mask) are indicated by blue asterisks and the NM patients (that don't use mask) are indicated by red circles.

In the case of tests collected until 3rd day, RM patients with COVID-19 had probability of 50.0% [95% CI: 39.6% - 60.4%] of high viral load, against a probability of 72.7% [95% CI: 49.8% - 89.3%] for NM patients. That difference is statistically significant (p-value 0.0154).

When the test was performed four days or more after the onset of symptoms, the RM patients had a probability of 30.3% [24.7% - 36.4%] of high viral load, against a probability of 35.7% [24.6% - 48.1%] for NM patients, a not significant statistical difference (p-value 0.1038).

Figure 2 shows the probabilities of high and non-high viral load across groups of patients, considering if they use face masks regularly (RM) or not (NM) for patients tested until three days after symptom onset.

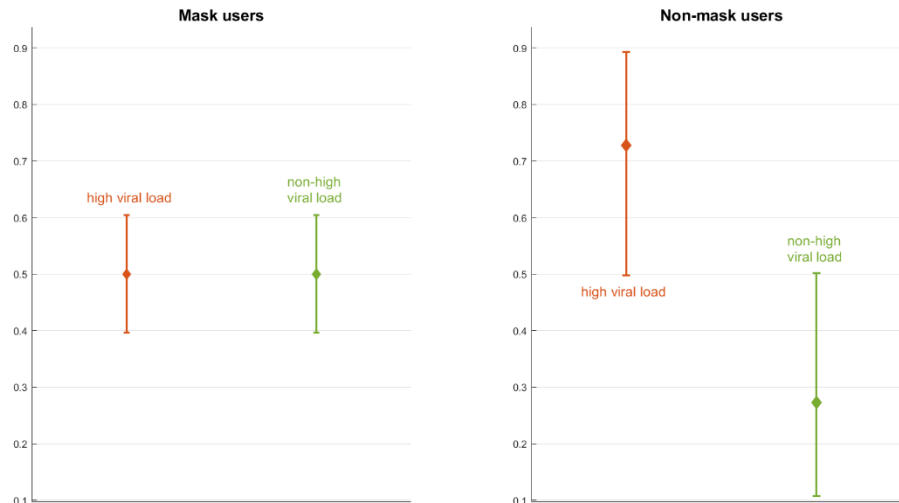


Figure 2. Conditional probabilities that a patient positive to SARS-CoV-2 has infection with high viral load (orange), or non-high viral load (green), given that the patient reported regular use of mask (left group) or reported not wearing a mask regularly (right group). Patients collected material until 3rd day of symptom onset. The bars superimposed on the probability estimates represent the 95% confidence interval of each estimate.

Discussion

The present study provides additional information that complements former studies on the effects of mask usage. Patients reporting regular use of face masks presented a lower proportion of high viral load cases when compared to those not using face masks regularly. This difference was significant when the symptoms had begun until three days before the RT-PCR test. Up to the authors' knowledge, no previous study has examined the association between face mask usage and the viral load in patients with COVID-19.

The smaller difference observed between the viral loads found in mask users and non-mask users when the test was performed from the 4th day after symptom onset may be partly explained by the expected reduction in viral load after an initial peak in the first days. This trend to the occurrence of smaller proportions of high viral loads as the time interval from symptom onset to the diagnosis test increases can be observed in Figure 1.

In the current study, all participants presented symptoms compatible with COVID-19 at the moment of data collection. Therefore, this study brings no information about the effect of masks in avoiding infection by SARS-CoV-2. The effect of face masks in avoiding infection by SARS-CoV-2 was examined in other studies ^{6,7,8,9,10,11}.

Our findings are compatible with other studies ^{9,10}, which showed that masks significantly reduce the exposition of individuals to SARS-CoV-2 in droplets and aerosols, although not eliminating the risk of being infected.

Viral load is correlated to disease severity¹³, and measures to reduce it should be encouraged. Nevertheless, it is important to emphasize that many other variables can

affect the viral load, such as collection technique, storage condition, patient immunity, and other pre-analytical, analytical, and post-analytics factors¹³. In this sense, limitations of the present study include that, apart from Ct values on RT-PCR tests, no other immunological or clinical aspects that impact viral loads were obtained from participants. Another limitation is that the type of mask was not asked to the participants that wore masks; therefore no inference could be extracted concerning that variable.

Conclusion

The present study showed that face mask usage was associated with a smaller probability of high viral load in symptomatic patients, mainly when the first symptoms emerge. Our findings reinforce the importance of face mask usage as a public health measure to reduce the spread of the virus in the community.

Ethical Approval

The research was approved by the UFMG Ethics Committee, CAAE-35074720.3.0000.5149.

References

1. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **J Adv Res.** 2020;24:91-98. Published 2020 Mar 16. doi:10.1016/j.jare.2020.03.005
2. Javid B, Weekes MP, Matheson NJ. Covid-19: should the public wear face masks?. **BMJ.** 2020;369:m1442. Published 2020 Apr 9. doi:10.1136/bmj.m1442
3. Chughtai AA, Seale H, Macintyre CR. Effectiveness of Cloth Masks for Protection Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Emerg Infect Dis.** 2020;26(10):e200948. doi:10.3201/eid2610.200948
4. Howard J, Huang A, Li Z, et al. An evidence review of face masks against COVID-19. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2021;118(4):e2014564118. doi:10.1073/pnas.2014564118
5. Leung NHL, Chu DKW, Shiu EYC, et al. Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks. **Nature Med.** 2020 Apr 3; 26:676-680. doi:10.1038/s41591-020-0843-2
6. Clapp PW, Sickbert-Bennett EE, Samet JM, et al. Evaluation of Cloth Masks and Modified Procedure Masks as Personal Protective Equipment for the Public During the COVID-19 Pandemic [published correction appears in JAMA Intern Med. 2021 Apr 1;181(4):570]. **JAMA Intern Med.** 2021;181(4):463-469. doi:10.1001/jamainternmed.2020.8168
7. Cheng VC, Wong SC, Chuang VW, et al. The role of community-wide wearing of face mask for control of coronavirus disease 2019 (COVID-19) epidemic due to SARS-CoV-2. **J Infect.** 2020;81(1):107-114. doi:10.1016/j.jinf.2020.04.024

8. Mitze T, Kosfeld R, Rode J, Wälde K. Face masks considerably reduce COVID-19 cases in Germany. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2020;117(51):32293-32301. doi:10.1073/pnas.2015954117
9. Kwon S, Joshi AD, Lo CH, et al. Association of social distancing and face mask use with risk of COVID-19. **Nat Commun**. 2021;12(1):3737. Published 2021 Jun 18. doi:10.1038/s41467-021-24115-7
10. Wang Y, Tian H, Zhang L, et al. Reduction of secondary transmission of SARS-CoV-2 in households by face mask use, disinfection and social distancing: a cohort study in Beijing, China. **BMJ Global Health**. 2020;5:e002794. doi:10.1136/bmjgh-2020-002794
11. Sugimura M, Chimed-Ochir O, Yumiya Y, et al. The Association between Wearing a Mask and COVID-19. **Int J Environ Res Public Health**. 2021;18(17):9131. Published 2021 Aug 30. doi:10.3390/ijerph18179131
12. Costa MS, Sato HI, Rocha RP, et al. Adjusting the Cut-Off and Maximum Pool Size in RT-qPCR Pool Testing for SARS-CoV-2. **Viruses**. 2021;13(4):557. Published 2021 Mar 26. doi:10.3390/v13040557
13. Rabaan AA, Tirupathi R, Sule AA, et al. Viral Dynamics and Real-Time RT-PCR Ct Values Correlation with Disease Severity in COVID-19. **Diagnostics (Basel)**. 2021;11(6):1091. Published 2021 Jun 15. doi:10.3390/diagnostics11061091