



RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

A Tempestade do Coronavírus

Uma Pandemia na Bancada do
Laboratório Clínico

EDIÇÃO ESPECIAL

Volume 52 – Número 02 | Ano 2020



RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

Editor-chefe/Editor-in-Chief
Paulo Murillo Neufeld (RJ)

Editor Emérito/Honorary Editor
Mateus Mandu de Souza (RJ)

Editores Associados/Associate Editors
Mauren Isfer Anghebem (PR)
Paulo Jaconi Saraiva (RS)

Publicação oficial da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC
Official Publication of Brazilian Society of Clinical Analyses

Volume 52 - Número 2 - 2020 - Edição Especial - COVID-19
Edição online - ISSN 2448-3877

Produção Editorial/Publisher
Trasso Comunicação Ltda
www.trasso.com.br



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

DIRETORIA EXECUTIVA/EXECUTIVE BOARD

Luiz Fernando Barcelos (RS)
Presidente/President

Maria Elizabeth Menezes (SC)
Vice-Presidente/Vice-President

Lenira da Silva Costa (RN)
Secretária-Geral/General Secretary

Mauren Isfer Anghebem (PR)
Secretária/Secretary

André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)
Tesoureiro/Treasurer

Paulo Aparecido Brandão Pinto (SP)
Tesoureiro Adjunto/Assistant Treasurer

Conselho Fiscal/Fiscal Board Titulares/holders

Vanderlei Eustáquio Machado (MG)
Alverne Passos Barbosa (GO)
Jurandi David da Silva (PE)

Suplentes/Alternates

Nilson Lima Lopes (BA)
Tereza Neuma de Souza Brito (RN)
Paulo Roberto Hatschbach (PR)

Endereço para correspondência/Editorial Office

Rua Vicente Licínio, 99 - Tijuca
Rio de Janeiro, RJ - Brasil
20270-902 – Fone: 21 2187-0800 – Fax: 21
2187-0805 E-mail: rbac@sbac.org.br

Afiliações/Affiliations



Comitê Editorial/Editorial Board

Bioquímica Clínica/Clinical Biochemistry

Álvaro Largura (PR), Marcelo Quintão Mendes (MG), Geraldo Picheth (PR), Marileia Scartezini (PR), Arício Treitinger (SC), Paolo Mocarelli (ITA), Dulcineia Saes Parra Abdalla (SP), Ary Henrique Filho (GO), Daniel Mazziota (AR), Antenor Henrique Pinto Pedrazzi (SP), Jane Maciel Almeida Baptista (MG), Marinez Oliveira Sousa (MG), José Edson P. da Silva (RS), Rafael Noal Maresco (RS)

Citologia Clínica/Clinical Cytology

Rita Maria Amparo Bacelar Palhano (MA), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ), Carlos Eduardo de Queiroz Lima (PE), Rita Gorete Amaral (GO), Alexandre Sherley Casimiro Onofre (SE), Sílvia Helena Rabelo Guimarães (GO)

Controle de Qualidade/Quality Control

José Abol Corrêa (RJ), Luiz Fernando Barcelos (RS), Mateus Mandu de Souza (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Gabriel de Souza Lima Oliveira (SP)

Endocrinologia/Endocrinology

Carlos Alberto Camargo (SP), Ana Maria Menezes (SP)

Toxicologia/Toxicology

Regina Helena Queiroz (SP), Maria da Graça Almeida (RN)

Microbiologia Clínica/Clinical Microbiology

Antônio Márcio Lopes (MG), Raimundo Diogo Machado (RJ), Estevão José Colnago (RJ), Amauri Braga Simionetti (RS), Cássia Maria Zoccoli (SC), Carmen Paz Oplusti (SP), Raissa Mayer R. Catão (PB)

Imunologia Clínica/Clinical Immunology

Mateus Mandu de Souza (RJ), Paulo Jaconi Saraiva (RS), Antônio Walter Ferreira (SP), Adelaide José Vaz (SP), Sílvia Fernandes R. da Silva (CE), Manuela Berto Pucca (SP)

Parasitologia Clínica/Clinical Parasitology

Antônio Pedro Soares (MG), Geraldo Atilio de Carli (RS), Jerolino Lopes Aquino (MT), Alverne Passos Barbosa (GO), Mauren Isfer Anghebem (PR)

Micologia Clínica/Clinical Micology

Paulo Murillo Neufeld (RJ), Maria José Gianini (SP), Regina Célia Candido (SP), Rosane Rhan (MT)

Biologia Molecular/Molecular Biology

Mario Hiroyuki Hirata (SP), Rosário Dominguez Crespo Hirata (SP), Marcelo Ávilla Mascarenhas (RS), Kelly Melo (SP), Maria Elizabeth Menezes (SC)

Hematologia Clínica/Clinical Hematology

Jorge Fernando Teixeira Soares (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Celso Spada (SC), Paulo César Naoum (SP), Julio Cezar Merlin (PR), Paulo Henrique da Silva (PR), Robson Ferreira Ferraz Santos (RJ), José Edson Paz da Silva (RS)

Entidades mantidas pela SBAC Entities maintained by the SBAC

PNCQ – Programa Nacional de Controle de Qualidade/National Program of Quality Control

Coordenador/Coordinator:
Francisco Edison Pacifici Guimarães (RJ)

SNA / DICQ – Sistema Nacional de Acreditação/ National System of Accreditation

Coordenador/Coordinator:
André Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)

CEPAC – Centro de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas

Post Graduation Center
Coordenadora/Coordinator:
Maria Elizabeth Menezes (SC)

CB-36 – ABNT

Superintendente/Superintendent:
Humberto Marques Tiburcio (MG)

CSM-20

Coordenador Técnico/Technical Coordinator
Luiz Fernando Barcelos (RS)

Comissões Institucionais/ Institutional Commissions

Coordenador Geral/General Coordinator

Luiz Fernando Barcelos (RS)

Comissão de Congressos/Congress Commission

Coordenador Geral de Congressos/
General Congress Coordinator: Irineu K. Grinberg (RS)
Assessoria Científica/Scientific Advice:
Jerolino Lopes Aquino (MT); Luiz Fernando Barcelos (RS),
Marcos Kneip Fleury (RJ)

Normas e Habilitação/Norms and Qualification

Coordenação/Coordination:
Celso Rubens Loques Mendonça (RJ)
Membros/Members: Elvira Maria Loureiro Colnago (RJ),
Mateus Mandu de Souza (RJ), Estevão José Colnago (RJ),
Luiz Fernando Barcelos (RS)

Ensino/Education

Paulo Murillo Neufeld (RJ), Celso Rubens Loques Mendonça (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ), Mateus Mandu de Souza (RJ)

Ética/Ethics

Henrique Tommasi Netto (ES), Francisco Einstein do Nascimento (CE), Maria da Conceição L. Oliveira (SE)

Sumário/Contents

EDITORIAL / EDITORIAL

- 108** RBAC Especial – COVID-19
Special RBAC – COVID-19
Barcelos LF

ARTIGO DE REVISÃO / REVIEW

- 109** Biossegurança laboratorial na pandemia do SARS-CoV-2
Laboratory biosafety in the SARS-CoV-2 pandemic
Flávia Martinello
- 117** Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil
The laboratory diagnosis of COVID-19 in Brazil
Nogueira JMR, Silva LOP
- 122** Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)
Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 by real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)
Menezes ME, Lima LM, Martinello F
- 131** A COVID-19 e o laboratório de hematologia: uma revisão da literatura recente
A COVID-19 and the clinical hematology laboratory: review
Fleury MK
- 138** Hemostasia e COVID-19: fisiopatologia, exames laboratoriais e terapia anticoagulante
Hemostasis and COVID-19: pathophysiology, laboratory tests and anticoagulant therapy
Batschauer APB, Jovita HW
- 143** A relação entre o sistema sanguíneo ABO e a COVID-19: uma revisão sistemática
The relationship between the ABO blood system and COVID-19: a systematic review
Geraldo A, Martinello F
- 149** A corrida pela vacina em tempos de pandemia: a necessidade da imunização contra a COVID-19
The vaccine race in pandemic times: the need for immunization against COVID-19
Silva LOP, Nogueira JMR
- 154** COVID-19 e Diabetes: a relação entre duas pandemias distintas
COVID-19 and Diabetes: two distinct pandemics and their relationship
Anghehem MI, Rego FGM, Picheth G
- 160** Insuficiência renal aguda em pacientes com COVID-19
Acute kidney injury in patients with COVID-19
Poloni JAT, Jahnke VS, Rotta LN

Sumário/Contents

168 Presença de RNA do SARS-CoV-2 em fezes de pacientes com COVID-19
Presence of SARS-CoV-2 RNA in faeces of COVID-19 patients
Michelson CM, Piccinini A

173 A COVID-19 e o diagnóstico da aspergilose pulmonar invasiva
COVID-19 and the invasive pulmonary aspergillosis diagnosis
Neufeld PM

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO / UPDATE

186 A arquitetura laboratorial e a proteção dos profissionais de saúde em tempos de COVID-19
Laboratory architecture and protection of health professionals in COVID-19 times
Nogueira JMR, Silva LOP

COMUNICAÇÃO BREVE / SHORT COMMUNICATION

192 Impacto do microbioma na COVID-19
Impact of the microbiome on COVID-19
Silveira ACO

CARTAO EDITOR / LETTER TO EDITOR

194 Papel do laboratório clínico na pandemia de Coronavírus
The role of the clinical laboratory in the Coronavirus pandemic
Terrão JLJ

196 Testes portáteis, remotos ou pontos de cuidados – TLPs – TLRs – POCT
Portable, remote tests or points of care – TLPs – TLRs – POCT
Grinberg IK

198 Alterações laboratoriais e a COVID-19
Laboratory alterations and COVID-19
Oliveira Junior RB, Lourenço PM

201 Relação neutrófilo-linfócito e resposta imune como fatores de prognóstico para COVID-19
Neutrophil-lymphocyte relationship and immune response as prognostic factors for COVID-19
Ramalho Alves JMR

203 Possíveis abordagens farmacológicas para SARS-CoV2
Possible pharmacological approaches to SARS-CoV2
Ribeiro GES

206 INSTRUÇÕES AOS AUTORES / INSTRUCTIONS FOR AUTHORS



Luiz Fernando Barcelos

RBAC Especial – COVID-19

Special RBAC – COVID-19

Não tenhamos dúvidas de que o ano de 2020 ficará registrado como um dos anos mais atípicos da história. O Coronavírus, que vem causando impacto em todos os setores da economia e da sociedade, também está provocando uma profunda mudança comportamental. Esforços gigantescos são realizados para contornar minimamente o problema e tentar vencer as dificuldades procurando reduzir os prejuízos. Muitas estratégias encontradas ficarão como legado para o futuro, pois se mostraram eficientes e muitas vezes mais econômicas do que as que vinham sendo adotadas.

Os sistemas de saúde de todos os países estão sendo postos à prova e mostrando suas fragilidades. No Brasil não poderia ser diferente: estamos vivendo momentos de muita angústia e tensão, seja pela insuficiência de leitos de UTI e equipamentos necessários para o atendimento adequado, em decorrência de um déficit histórico, seja pela alta morbidade da doença que atinge níveis de contaminação avassaladores.

Os laboratórios clínicos estão vivendo momentos muito difíceis, encontrando dificuldades com os reagentes disponíveis e com o comportamento atípico da doença – tanto em relação ao vírus em si quanto à resposta imunológica dos pacientes, que não têm seguido o padrão tradicional das demais doenças infecciosas.

A SBAC, sempre atenta às dificuldades do setor, criou num primeiro momento a editoria COVID-19 para concentrar todas as informações disponíveis sobre este assunto. A quantidade de acessos nos gratificou e mostrou que estávamos no caminho certo.

Juntamente com outras entidades, participamos de uma força tarefa com o objetivo de avaliar os reagentes diagnósticos disponíveis no mercado, testando o seu desempenho no decorrer da doença e fornecendo informações valiosas para os laboratórios. Este trabalho é realizado num grupo selecionado de laboratórios do país, com acesso pelo endereço www.testecovid19.org

Também nos meses de agosto, setembro, outubro e novembro estamos apresentando o SBAC Digital, um evento dedicado a discutir todos os aspectos inerentes à COVID-19, gratuito para os associados da SBAC e para os convidados dos patrocinadores.

A RBAC não poderia deixar de dar sua contribuição em respeito aos nossos leitores cujos acessos à revista têm se mostrado sempre crescente e estamos apresentando este número especial totalmente dedicado à discussão da doença com artigos redigidos por especialistas e que, temos certeza, será de grande valor para o maior entendimento da COVID-19.

Foram selecionados aspectos importantes quanto à biossegurança, os impactos renais, hematológicos e na hemostasia, as características do diagnóstico laboratorial, apenas para citar alguns entre outros não menos importantes sobre a doença.

Por fim, desejamos a todos muita saúde e tranquilidade neste momento de angústia e queremos deixar registrado os nossos sentimentos às famílias que lastimavelmente perderam entes queridos.

Luiz Fernando Barcelos

Presidente da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Biossegurança laboratorial na pandemia do SARS-CoV-2

Laboratory biosafety in the SARS-CoV-2 pandemic

Flávia Martinello

Resumo

Devido à emergência do SARS-CoV-2, os laboratórios necessitaram se adequar na mesma velocidade em que a pandemia se instalou para atender com segurança à crescente demanda pelos testes diagnósticos. Com o alto potencial de disseminação do vírus, o contato com pacientes e o manuseio laboratorial das amostras tornou-se um desafio sem precedentes para os laboratórios. A necessidade de práticas de biossegurança nunca foi globalmente tão enfatizada como nas circunstâncias atuais da pandemia. O objetivo desta revisão narrativa foi destacar medidas para prevenção da contaminação pelo SARS-CoV-2 nos laboratórios clínicos, utilizando como referência a literatura publicada em livros, artigos científicos, orientações técnicas de autoridades sanitárias e científicas, e na análise crítica e pessoal da autora. Alguns temas abordados foram: compreensão dos riscos, medidas de biossegurança, níveis de biossegurança, barreiras de contenção, uso correto dos equipamentos de proteção individual (EPI), desinfecção das áreas de laboratório, descarte seguro de resíduos, e biossegurança nas fases pré-analítica e analítica. As orientações são baseadas em evidências limitadas e frequentemente fracas, oriundas de opiniões, estudos observacionais ou extrapolações de epidemias anteriores causadas por outros coronavírus. As boas práticas de biossegurança destacadas foram estabelecidas muito antes do surgimento da COVID-19. No entanto, a pandemia trouxe à tona, aos profissionais de laboratório e à população em geral, boas práticas que estavam esquecidas, como a higienização das mãos, a etiqueta respiratória e a forma correta de paramentação e desparamentação dos EPI. Na pandemia, os laboratórios com poucos recursos necessitaram adaptar soluções seguras e econômicas para garantir a segurança laboral.

Palavras-chave

Biossegurança; COVID-19; SARS-CoV-2; pandemia; laboratórios; equipamento de proteção individual (EPI)

INTRODUÇÃO

Com a emergência do novo Coronavírus (SARS-CoV-2), os laboratórios necessitaram se adequar na mesma velocidade da pandemia para atender com segurança à crescente demanda pelos testes diagnósticos.

Na maioria dos casos, o SARS-CoV-2 é transmitido de humano para humano por inalação ou deposição de aerossóis ou gotículas respiratórias nas superfícies mucosas. Outras rotas identificadas são o contato com fômites contaminados pelo vírus, por meio das próprias mãos.⁽¹⁻³⁾

A propagação de gotículas é dependente de fatores como o tamanho das partículas, a velocidade do ar expirado, as condições de temperatura e umidade ambiente.⁽⁴⁾ As gotículas respiratórias grandes caem a uma distância de aproximadamente 1 m do indivíduo durante a respiração normal e conversação. Tossir ou espirrar aumenta a

distância de propagação para 2 m e 6 m, respectivamente.⁽⁴⁾ Após uma tosse ou espirro, as gotículas maiores percorrem uma distância maior, mas se depositam rapidamente, e 50% das gotículas são aerossolizadas podendo permanecer no ar por períodos mais longos e ser transportadas por distâncias até pouco mais de 1 m.⁽⁵⁾ Esses dados fundamentam o distanciamento social de pelo menos 2 m⁽⁵⁾ recomendado pela Organização Mundial da Saúde, e tanto quanto possível, inclusive, dentro de estabelecimentos de saúde como os laboratórios clínicos.⁽²⁾

Como o vírus possui um potencial excepcionalmente alto de disseminação, o contato com pacientes e o manuseio laboratorial seguro das amostras tornou-se um desafio sem precedentes para os laboratórios em todo o mundo.⁽¹⁾ Um aspecto importante, destacado por muitas organizações de saúde, é que a pandemia de COVID-19 pode ser especialmente perigosa para os profissionais de saúde.^(2,6)

Professora do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis-SC, Brasil.

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis-SC, Brasil.

Recebido em 03/08/2020
Artigo aprovado em 17/08/2020
DOI: 10.21877/2448-3877.20200011

A necessidade de práticas de biossegurança nunca foi globalmente tão enfatizada como nas circunstâncias atuais da pandemia.⁽¹⁾ Biossegurança é a ciência voltada para a prevenção, controle, minimização ou eliminação de riscos de dano ou acidente advindos da prática em laboratório para proteção da saúde humana, animal, do meio ambiente e da qualidade dos trabalhos desenvolvidos.⁽⁷⁾ Práticas de biossegurança laboratorial é a aplicação dos conhecimentos, técnicas e equipamentos para mitigar o risco, nesse caso envolvido no manuseio da amostra biológica, e propiciar um ambiente laboral seguro.⁽¹⁾

O objetivo desta revisão narrativa foi destacar medidas para prevenção da contaminação pelo SARS-CoV-2 nos laboratórios clínicos, utilizando como referência a literatura publicada em livros, artigos científicos, orientações técnicas de autoridades sanitárias e científicas, na análise crítica e pessoal da autora. Alguns temas abordados foram: compreensão dos riscos, medidas de biossegurança, níveis de biossegurança, barreiras de contenção, uso correto dos equipamentos de proteção individual (EPI), desinfecção das áreas de laboratório, descarte seguro de resíduos e biossegurança nas fases pré-analítica e analítica.

Medidas de biossegurança

A definição das práticas de biossegurança irá depender da respectiva avaliação de risco de cada laboratório. A avaliação de risco envolve a análise crítica de todo o processo laboratorial (coleta e recebimento das amostras, testes de rotina, testes moleculares, descarte de amostras, etc.) e relação de todos os perigos.⁽²⁾ Para cada perigo estima-se a chance e as consequências da exposição ao mesmo, seguida das medidas de controle apropriadas para reduzir os riscos a níveis aceitáveis.^(1,3,6,8,9)

É importante observar que os perigos, isoladamente, não representam risco ao indivíduo. O risco só existe se há exposição. Portanto, os equipamentos e procedimentos utilizados devem ser considerados na análise do risco, pois podem aumentar ou diminuir o mesmo. Um mesmo perigo pode estar presente em mais de uma etapa, por exemplo, a exposição a aerossóis ou respingos.^(1,3,8) Em ordem crescente de eficiência, as estratégias para controle do risco são: utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), medidas administrativas (como normas e sinalizações de segurança), soluções de engenharia (isolar a equipe do perigo), substituir e eliminar o perigo (essas duas últimas não são possíveis no caso da pandemia, cujo perigo é o SARS-CoV-2).⁽¹⁰⁾

Entre as medidas de biossegurança, a estratégia de distanciamento social dentro do laboratório pode reduzir as infecções por SARS-CoV-2 entre os colaboradores. O distanciamento pode ser alcançado separando os profissionais em duas (ou mais) equipes (escala de trabalho de

12 horas com folga de 36 horas), de modo que as equipes não tenham contato. As estações de trabalho no laboratório podem ser espaçadas. A equipe que avalia/valida os resultados, que avalia o controle da qualidade ou realiza tarefas mais administrativas pode ser removida do espaço do laboratório e fazer o trabalho em um espaço de escritório ou remotamente. Recomenda-se que o uso dos espaços de refeição seja escalonado para evitar a reunião do grupo. A educação continuada e os treinamentos também devem ser realizados de forma remota.^(1,9) A política de imunização contra a gripe também fornece proteção aos colaboradores do laboratório e reduz a suspeita de infecção por SARS-CoV-2 na equipe em situações de emergência.⁽³⁾

Durante a pandemia da COVID-19, todas as amostras coletadas para testes de diagnóstico *in vitro* devem ser consideradas potencialmente infecciosas com SARS-CoV-2. Portanto, os profissionais de laboratório devem seguir rigorosamente as boas práticas laboratoriais em microbiologia e as precauções padrão para minimizar o risco de exposição ao vírus, como a utilização de calça comprida, sapato fechado, cabelo preso e não utilização de adornos.^(2,11)

A higiene frequente das mãos e evitar tocar os olhos, nariz e boca são medidas universalmente recomendadas, às quais a equipe do laboratório também deve aderir.⁽²⁾

Nível de biossegurança

Os agentes biológicos que afetam o homem, os animais e as plantas são classificados conforme o risco que oferecem em Classes de Risco de 1 a 4. A primeira inclui agentes que não oferecem risco para os indivíduos e comunidade e há tratamento e profilaxia disponíveis, e a última inclui agentes que oferecem altíssimo risco individual e altíssima capacidade de propagação na comunidade para os quais não há medidas profilática e terapêutica disponíveis.⁽⁷⁾ O SARS-CoV-2, à semelhança dos demais membros da família Coronaviridae, é classificado como microrganismo de Classe de Risco 3.^(7,8)

Para trabalho em contenção dos agentes biológicos há quatro níveis de biossegurança (NB) de laboratórios. Geralmente o NB é proporcional à classe de risco do agente, porém, certos procedimentos ou protocolos experimentais podem exigir um maior ou menor grau de contenção.⁽⁷⁾ Os NB dos laboratórios predizem as características de construção, projeto, equipamentos, instalações de contenção, práticas padrão e técnicas operacionais, garantindo a execução de atividades com agentes infecciosos de diferentes grupos de risco.^(7,12)

No caso do SARS-CoV-2, testes laboratoriais de rotina em espécimes de soro ou sangue, manipulação de vírus lisados, fixados, partes não infecciosas do genoma, embalo de amostras biológicas para diagnóstico e outras

atividades não propagativas (por exemplo, sequenciamento, teste de amplificação de ácidos nucleicos) requerem que o laboratório apresente estrutura equivalente ao NB2 e sejam realizadas em cabine de segurança biológica utilizando as precauções padrão. As atividades consideradas propagativas, como culturas virais, isolamento viral ou testes de neutralização devem ser realizadas em um laboratório de contenção com fluxo de ar direcional (pressão negativa de ar) equivalente a NB3.^(7,8,12)

Barreiras de contenção

Cabine de Segurança Biológica (CSB)

A CSB é o principal equipamento de contenção física para agentes infecciosos e, dependendo do tipo, protege o material e/ou o profissional e os ambientes interno e externo por filtração do ar com filtros de alta eficiência do tipo HEPA.⁽¹³⁾

A CSB de Classe I protege o profissional e o ambiente. Existem quatro subtipos de CSB Classe II que protegem o profissional, o produto e o ambiente. Nas cabines A1 e A2, 70% do ar recircula na câmara e 30% são expelidos após passagem pelo filtro HEPA. A diferença entre elas está na velocidade de circulação do ar, que é menor na primeira. Na cabine B1 apenas 30% do ar recircula e 70% são expelidos, e na cabine B2 100% do ar é expelido para o exterior. A CSB Classe III fornece o mais alto nível de proteção ao profissional, produto e ambiente, pois são cabines fechadas com acesso à área de trabalho por grandes luvas e caixa de passagem para entrada do material antes do início das atividades.⁽¹³⁾

Todos os procedimentos com amostras clinicamente suspeitas ou confirmadas com SARS-CoV-2 devem ser realizados em CSB Classe II tipo A2. A Organização Mundial da Saúde (OMS) aprova o uso de CSB Classe I como uma alternativa que protege o trabalhador quando a proteção da amostra não é a prioridade.^(1,13) Para aquisição, a diferença de custo é insignificante entre as duas.⁽¹⁾

Alerta-se para os laboratórios que utilizam erroneamente cabines de fluxo laminar (câmaras de escoamento de ar horizontais e verticais) para manipular amostras biológicas, estas protegem apenas o produto, são mais perigosas, pois expõem a equipe do laboratório diretamente ao fluxo de ar que carrega potenciais aerossóis carregados com risco biológico.^(1,13)

O uso e a manutenção corretos da CSB são essenciais para garantia da qualidade das atividades. O profissional deve estar paramentado com todos os EPI necessários ao utilizar uma CSB.

Equipamentos de Proteção Individual (EPI)

EPI é todo dispositivo de uso individual utilizado pelo trabalhador destinado à segurança laboral. Para ser consi-

derado EPI, o dispositivo deve ter o Certificado de Aprovação (CA) expedido pelo órgão nacional competente para que se possa responsabilizar legalmente o fabricante caso este apresente alguma falha ou defeito.⁽¹⁴⁾ É interessante destacar que o jaleco (também conhecido por avental e guarda-pó) que não apresentar CA deve ser tratado como vestimenta ou uniforme.

Embora os EPI sejam considerados como uma estratégia de prevenção primária, não deve ser alternativa única para a prevenção da transmissão do vírus SARS-CoV-2. A eficácia dos EPI depende do manuseio adequado, treinamento para colocação e retirada, prática de higiene das mãos e comportamento humano, o qual pode representar um risco até maior do que o próprio agente biológico.^(1,3) O uso racional, correto e consistente dos EPI disponíveis e a higienização das mãos durante todo o turno de trabalho ajudam a reduzir a disseminação dos patógenos.^(2,3)

Para as atividades não propagativas com amostras biológicas recomenda-se a utilização de avental à prova d'água e dos seguintes EPI: máscara facial e óculos de proteção ou protetor facial tipo viseira (*face shield*) e luvas descartáveis.^(3,8)

Para as atividades propagativas com amostras biológicas, além dos EPI utilizados em atividades não propagativas, recomenda-se a utilização de aventais descartáveis com gramatura mínima de 30 g/m² de fechamento traseiro, touca e sapatilhas descartáveis (propé).^(3,8)

A máscara de proteção respiratória com eficácia mínima de 95% na filtração de partículas de até 0,3 μ (sistema americano: tipo N95, N99, N100 e sistema europeu: peça facial filtrante PFF 2 ou PFF3) deve ser utilizada pelo profissional da saúde que for atuar em procedimentos de pacientes clinicamente suspeitos ou infectados com a COVID-19 com risco de geração de aerossóis. Se a máscara de proteção respiratória estiver íntegra, limpa e seca, poderá ser usada várias vezes durante o mesmo plantão, pelo mesmo profissional, por até 12 horas ou conforme definido pelo serviço de saúde. Excepcionalmente, em situações de falta de materiais para atender demanda da pandemia da COVID-19, a máscara respiratória N95 ou equivalente poderá ser reutilizada pelo mesmo profissional da saúde, desde que siga rigorosamente as recomendações para retirada adequada desta máscara. Para minimizar a contaminação da máscara respiratória poderá ser utilizado o protetor facial.^(1,15)

A máscara N95 ou PFF2 com válvula de exalação facilita a saída do ar exalado, entretanto, também a passagem de gotículas. Portanto, protege o profissional, mas não o paciente.⁽¹⁶⁾

A máscara N95 é a maneira mais eficaz, entre as opções disponíveis, de proteção respiratória. Embora a N95 limite a transmissão de vírus, ainda não o bloqueia com-

pletamente. Ao mesmo tempo, não significa que a transmissão do vírus resultará na transmissão da infecção. Pessoas com barba não são protegidas de aerossóis, mesmo que usem máscaras N95.^(1,17) O uso de máscara é recomendado mesmo quando trabalhando na CSB.⁽²⁾

As máscaras cirúrgicas não são tão eficientes como equipamento de proteção respiratória,^(1,17) mas podem ser uma medida alternativa ao distanciamento social quando este se torna impraticável entre os colaboradores. Nesse caso, qualquer tipo de máscara facial será eficaz para evitar o contágio inter-humano na possível circunstância de um profissional de laboratório estar infectado pelo SARS-CoV-2.⁽²⁾

Os protetores faciais oferecem melhor ergonomia em comparação com os óculos de segurança. O uso de óculos com máscaras geralmente resulta no acúmulo de névoa ao redor dos óculos em pouco tempo, dificultando a visão. As viseiras e óculos de proteção podem ser reutilizados após a desinfecção apropriada. Nesse momento de escassez no mercado devido à pandemia é compreensível a adaptação de EPI como a *face shield*.⁽¹⁾

Como vestimenta, se forem utilizados jalecos de algodão, os mesmos devem ser retirados adequadamente e descontaminados após cada uso antes da lavagem e reutilização. Os jalecos descartáveis são a melhor opção para o vestuário dos profissionais de saúde. No entanto, devido à escassez durante a pandemia, aventais de plástico descartáveis também podem ser usados.⁽¹⁾

Calçar luvas de procedimentos é uma questão relativamente fácil, mas a retirada descuidada após exposição ao risco pode representar uma ameaça de transmissão da infecção.^(1,17)

Uma pesquisa demonstrou que o maior desafio relatado por laboratórios clínicos durante a pandemia do COVID-19 foi a garantia de EPI suficientes. Entre outras dificuldades também foi relatado o uso e o descarte incorreto de EPI.^(17,18)

Higienização do laboratório

As evidências atuais sugerem que o SARS-CoV-2 pode permanecer viável por horas e até dias em determinadas superfícies, dependendo do tipo de material. Portanto, a limpeza de objetos e superfícies, seguida de desinfecção, são medidas recomendadas para a prevenção da COVID-19 e de outras doenças respiratórias virais em ambientes comunitários.

Limpeza – refere-se à remoção de germes, sujeiras e impurezas das superfícies. A limpeza não mata os germes, mas, ao removê-los, diminui o número e o risco de propagação da infecção.

Desinfecção – refere-se ao uso de produtos químicos para matar germes em superfícies. Esse processo não

limpa necessariamente superfícies sujas ou remove microrganismos, mas, ao matar germes em uma superfície após a limpeza, pode reduzir ainda mais o risco de propagação de infecções.⁽¹⁹⁾

A descontaminação de bancadas de trabalho, instrumentos e superfícies frequentemente tocadas no laboratório como maçanetas, refrigeradores, freezers, telefones, telas sensíveis ao toque, teclados, mouse, etc. deve ser realizada com mais frequência, a cada três horas ou quando houver qualquer derramamento. Considerando que a camada externa do envelope dos coronavírus é facilmente destruída, os produtos apropriados para assepsia são etanol a 70%, glutaraldeído a 2% ou hipoclorito de sódio com concentração de cloro 0,05% (500 ppm).^(2,20)

Os equipamentos de laboratório, tomadas elétricas e interruptores não devem ser desinfetados com hipoclorito devido ao poder oxidante e corrosivo do mesmo. Toalhas de papel embebidas com álcool 70% são preferíveis nesses casos, e os equipamentos elétricos devem estar desconectados da fonte de alimentação durante a desinfecção. Paredes e pisos não requerem desinfecção e podem ser limpos com água e sabão comuns, exceto em caso de derramamento de material biológico. Nesse caso, os mesmos produtos de desinfecção das bancadas são recomendados.⁽¹⁾

Em caso de derramamento de material infectante, o equipamento ou área devem ser isolados e procedida a desinfecção. Caso seja no chão, cobrir o local de derramamento com material absorvente (papel toalha) para minimizar a área afetada e a produção de aerossóis. Cobrir o local com cloro ativo 2%, de forma concêntrica, iniciando pelo exterior da área de derrame e avançando para o centro. Deixar em repouso pelo menos trinta minutos para ação do desinfetante. Retirar os materiais envolvidos no acidente, inclusive objetos cortantes, utilizando uma pinça ou um pedaço de cartão rígido para recolher o material e colocá-lo em um recipiente resistente para descarte final.^(2,6)

Ácido peracético (2 g/L) ou H₂O₂ 3% ou dióxido de cloro 100 mg/L podem ser usados para fumigar o laboratório durante a noite, ou desinfetante em aerossol pode ser pulverizado a cada uma a duas horas.^(2,6)

Gerenciamento de resíduos

O descarte seguro de sobras de amostras de pacientes com COVID-19 tem sido um aspecto preocupante nos laboratórios.⁽¹⁾ Segundo o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), atualmente não há evidências que sugiram que esse resíduo de laboratório precise de procedimentos adicionais de embalagem ou desinfecção. Portanto, os laboratórios devem proceder ao descarte das sobras de amostras de acordo com as diretrizes locais de segurança,^(1,21) atualmente a RDC 222/2018.⁽²²⁾

Segundo a RDC 222/2018, as sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos, bem como as culturas, estoques de microrganismos, os meios de cultura e os instrumentos utilizados para transferência ou inoculação de microrganismos da classe de risco 3 são classificados como resíduos do Grupo A1. No entanto, os últimos devem ser tratados na unidade geradora e os primeiros antes da disposição final, podendo ou não ser no laboratório. Caso seja tratado na unidade geradora ou no serviço, devem ser acondicionados em sacos brancos leitosos. Caso o tratamento venha a ser realizado fora da unidade geradora ou do serviço, estes resíduos devem ser acondicionados em saco vermelho e transportados em recipiente rígido, impermeável, resistente à punctura, ruptura, vazamento, com tampa com controle de fechamento e identificado. O tratamento deve atender ao nível III de inativação microbiana, por exemplo, a autoclavação.⁽²²⁾

Entretanto, caso seja permitido pelos órgãos ambientais e pelos serviços de saneamento competentes, as sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos podem ser descartadas diretamente no sistema de coleta de esgotos.⁽²²⁾

Um estudo demonstrou que apenas um quarto dos laboratórios pesquisados declarou autoclavar amostras de sangue antes do destino final. Os autores sugerem que, durante a pandemia, amostras de alto risco, como amostras respiratórias, devem ser desinfetadas ou autoclavadas logo após a análise.^(6,23)

Biossegurança na fase pré-analítica

Atendimento ao público em geral

As máscaras cirúrgicas devem ser usadas pelos profissionais em área de atendimento a pacientes. Em relação ao tempo de uso, é recomendada a troca da máscara cirúrgica pelo profissional nos serviços de saúde a cada duas a quatro horas devido ao risco de contaminação da mesma. Entretanto, devido à pandemia da COVID-19, o CDC preconizou o uso prolongado de máscaras faciais pelos profissionais da saúde, ou seja, usar a mesma máscara, mesmo em contato próximo com pessoas diferentes, sem removê-la entre os atendimentos. Todavia, a mesma deve ser removida, descartada e substituída por outra nova, se estiver suja, úmida, danificada, ou se o profissional apresentar dificuldade de respirar com ela.⁽¹⁵⁾ Os clientes também devem estar utilizando máscara durante o período em que permanecerem no laboratório.

Os laboratórios devem adotar estratégias de proteção à saúde de todos os colaboradores, terceirizados ou não. Cartazes e outros recursos visuais são ferramentas educativas e devem ser utilizadas minimamente para orientar a correta higienização das mãos, uso de máscaras e etiqueta respiratória.

Algumas estratégias que podem ser utilizadas para minimizar os riscos de infecção pelo SARS-CoV-2,^(2,24,25) aos quais os trabalhadores podem estar expostos durante suas atividades laborais, são:

- Utilizar tapete sanitizante na entrada do laboratório;
 - Medir a temperatura dos clientes com serviço ágil para não causar filas e aglomeração e se possível dispor de áreas de atendimento separadas;
 - Manter na entrada, de forma sinalizada, o ponto de higienização de mãos com água e sabão, papel descartável, lixeira com tampa acionada por pedal e álcool em gel 70%;
 - Diminuir o número de assentos vagos no espaço da recepção;
 - Colocar uma "linha" de contenção, aumentando a distância entre o paciente e o profissional da recepção;
 - Estabelecer marcações no chão (adesivo de piso informativo) com distanciamento de 1,5 metros para fila;
 - Retirar todos os objetos supérfluos que possam ser tocados pelos clientes na recepção (*folders*, revistas, cafeteira, filtro de água, brinquedos, etc.);
 - Proteger os teclados, mouses, máquinas de cartão, etc. com filme plástico para facilitar a descontaminação;
 - Utilizar rotas de circulação pré-estabelecidas para evitar o contato entre as pessoas;
 - Manter as janelas e portas de acesso sempre abertas. Caso seja necessário permanecer com ar-condicionado ligado deve-se ter atenção especial à limpeza dos filtros e ao direcionamento do fluxo de ar;
 - Triar sinais e sintomas de colaboradores antes da entrada, com termômetro de superfície. Se constatar febre, notificar o colaborador para buscar orientação e cuidado no sistema de saúde;
 - Quando necessário o uso de crachás para acesso, orientar os colaboradores sobre a higienização destes e sobre o não uso de cordões;
 - Tornar de uso individual objetos como caneta, lápis, calendário, etc.;
 - Fechar ou controlar o acesso às áreas de convivência (copas, cozinhas);
 - Oferecer o transporte de colaboradores de casa-laboratório-casa;
 - Priorizar escalas de trabalho 12 x 36.
- Somente pessoal treinado deve ter permissão para coleta, armazenamento, embalagem e transporte de amostras, garantindo que sejam utilizados procedimentos operacionais padrão adequados em consonância com as diretrizes nacionais ou da OMS, e que todas as amostras sejam tratadas como potencialmente infecciosas.⁽³⁾

Coleta de amostras

A coleta de amostras respiratórias ou de sangue de pacientes clinicamente suspeitos ou confirmados com

COVID-19 deve ser extremamente cuidadosa visto que o contato *per se* com o paciente expõe o profissional de saúde. Em especial, a coleta de amostras do trato respiratório superior, de *swab* naso e orofaríngeo, pode expor ainda mais o profissional de saúde pelo risco de ocorrência de espirro ou vômito, respectivamente, nos procedimentos.

Ao coletar sangue e outras amostras não respiratórias de pacientes clinicamente suspeitos ou confirmados com COVID-19, o profissional de saúde deve utilizar jaleco que cubra o máximo possível o corpo, máscara N95, luvas descartáveis e proteção para os olhos como óculos ou protetor facial.^(6,26) Sempre que possível, o profissional deve posicionar-se lateralmente ao paciente durante a coleta para evitar a troca direta do respirado.

Em ambiente hospitalar, a coleta de amostras respiratórias ou não de pacientes clinicamente suspeitos ou confirmados com COVID-19 deve ser realizada prioritariamente pela equipe de enfermagem, de forma a expor o menor número possível de profissionais.⁽²⁶⁾

Idealmente, o local de coleta de amostras de pacientes clinicamente suspeitos ou confirmados com infecção por microrganismos de classe de risco 3, como o SARS-CoV-2, deve ser equipado com pressão negativa de ar (exaustão) unidirecional com 12 trocas ou mais de ar por hora.^(2,26) Quando isso não for possível, um ambiente individual com ventilação natural com taxa média de ventilação de 160 L/s pode ser usado.^(6,26)

Depois de usar a sala individual, devem-se desinfetar as superfícies de acordo com o procedimento padronizado e deixar o ambiente vago por um período de aproximadamente trinta minutos. Durante o procedimento, deve ser evitada a entrada e saída de outras pessoas na sala.⁽²⁶⁾

Durante a pandemia, muitas vezes é difícil discriminar amostras clínicas coletadas de pacientes clinicamente suspeitos ou confirmados com COVID-19. Nesse contexto, uma marcação especial no rótulo de identificação da amostra indicando suspeita ou confirmada a contaminação por SARS-CoV-2 é uma boa prática, embora não esteja sendo realizada por cerca de metade dos laboratórios.⁽²³⁾

Transporte de amostras

Para o transporte externo de amostras deve ser utilizado o sistema de embalagem tripla. O recipiente primário deve ser de plástico e fechado com tampa de rosca. A superfície externa do recipiente primário deve ser desinfetada usando-se desinfetantes apropriados, como etanol a 70%, cuidando para não danificar a identificação do paciente. O recipiente primário deve ser envolvido com material absorvente suficiente para absorver todo o volume da amostra, caso haja quebra ou vazamento, e colocado em um recipiente secundário com a tampa do recipiente primário voltada para cima. O recipiente secundário deve ser fechado com tampa à prova d'água e de vazamentos.⁽²⁶⁾

Materiais de amortecimento, como plástico bolha ou flocos de isopor, devem ser colocados entre a embalagem secundária e a embalagem externa para reduzir agitação e impacto externo durante o transporte. Os documentos de informações da amostra devem ser colocados entre o recipiente secundário e a embalagem externa (recipiente terciário). A superfície do recipiente terciário deve exibir os contatos do remetente e do destinatário, bem como um rótulo UN3373 indicando uma substância infecciosa da Categoria B para amostras de casos suspeitos ou confirmados.^(6,26) Culturas ou isolados virais devem ser transportados como Categoria A UN2814, substância infecciosa que afeta seres humanos.⁽⁸⁾

Diferentemente das recomendações anteriores, agora o CDC recomenda o transporte de todas as amostras biológicas dentro da mesma instituição por sistema de tubos pneumáticos, exceto amostras respiratórias, o qual deve ser realizado pessoalmente.^(2,6,9,26) O pessoal que transporta a amostra deve ser treinado em procedimentos de descontaminação de derramamentos. Nesse caso, o recipiente primário deve ser embalado em saco tipo *zip-lock* e colocado em um recipiente secundário, tipo caixa térmica, que deve ser rotulado para indicar que contém substâncias infecciosas.^(6,9,26) Se não houver vazamentos visíveis no recipiente secundário ao receber uma amostra, o mesmo poderá ser reutilizado depois de desinfetado com substâncias apropriadas, como etanol a 70%.⁽²⁶⁾

Biossegurança na fase analítica

Procedimentos laboratoriais comuns como abertura manual de tubos, pipetagem, alíquotagem, agitação em vórtex, trituração, extração, homogeneização e centrifugação normalmente resultam na geração de aerossóis. Portanto, assim como o local de coleta de amostras, as atividades devem ser realizadas em local com direcionamento do fluxo de ar para impedir a propagação do vírus SARS-CoV-2.^(1,13)

Idealmente, o processamento inicial (antes da inativação) de todas as amostras, inclusive aquelas para sequenciamento e amplificação, deve ocorrer em uma CSB classe II tipo A2 validada.^(8,9)

Todos os procedimentos técnicos devem ser realizados de modo a minimizar a geração de aerossóis e gotículas.⁽⁸⁾ Se o recipiente da amostra precisar ser aberto fora da CSB, uma máscara N95 deve ser usada pelo pessoal e a bancada deve ser desinfetada após o procedimento.⁽²⁰⁾

As amostras submetidas à extração ou inativação de ácido nucleico na CSB podem ser manuseadas fora da CSB de acordo com as precauções padrão para amostras convencionais. Deve-se tomar cuidado para evitar a contaminação cruzada durante a extração de ácidos nucleicos e a adição de reagentes.⁽²⁰⁾

Caso a CSB não esteja disponível e seja necessária uma centrifugação, devem ser utilizadas centrífugas com rotores com tampa e com ventosas de segurança que protegem contra aerossóis e gotículas. Além disso, os tubos devem estar fechados e posicionados de forma equilibrada em uma centrífuga em área aberta bem ventilada. Não é recomendado forçar a parada da centrífuga. A centrífuga não deve ser aberta após pelo menos dois a dez minutos após a conclusão da operação para permitir a sedimentação dos aerossóis dentro do recipiente, ou trinta minutos caso haja quebra de tubo.^(1,2,6)

Estudos sugerem a inativação das amostras para a distribuição e estudo seguro das mesmas.⁽²⁰⁾ Recomenda-se que as amostras sejam colocadas a 56°C por trinta minutos para inativar o vírus antes de abrir o recipiente da amostra. No entanto, como as informações sobre a infectividade viral ainda são limitadas, as amostras devem ser consideradas de alto risco.⁽⁶⁾

Se a pele ou a mucosa for perfurada, cortada ou entrar em contato direto com o material suspeito de conter SARS-CoV-2, o indivíduo afetado deve retirar os EPI e lavar as áreas afetadas imediatamente, usar antisséptico de pele apropriado e procurar atendimento médico.⁽⁶⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O laboratório de análises clínicas está na linha de frente no combate à pandemia, produzindo resultados de testes para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com COVID-19 entre outros. Devido à natureza da transmissibilidade da doença, a equipe do laboratório enfrenta incertezas e receio de contrair a doença.

As boas práticas de biossegurança para coleta, transporte e manipulação de amostras clinicamente suspeitas ou confirmadas com microrganismos de classe de risco 3 foram estabelecidas muito antes do surgimento da COVID-19. No entanto, a alta transmissibilidade do SARS-CoV-2 trouxe à tona boas práticas clássicas que estavam esquecidas não só pela população em geral, mas também pelos profissionais de laboratório, como a higienização das mãos, a etiqueta respiratória e a forma correta de paramentação e desparamentação dos EPI.

Uma dificuldade desta revisão e provavelmente dos profissionais de saúde é que existem poucos documentos completos sobre biossegurança voltados especificamente para laboratórios clínicos, ou seja, aqueles com um nível geral 2 de biossegurança. Há vários manuais, diretrizes, livros, artigos, etc. com abordagens parciais de biossegurança ou que geralmente abordam testes microbiológicos e moleculares, com pouca orientação específica para o laboratório de forma geral. Corroborando a opinião de Lippi e colaboradores,⁽²⁾ as orientações são baseadas em evidências limitadas e frequentemente fracas, oriundas de

opiniões, estudos observacionais ou extrapolações de epidemias anteriores causadas pelos coronavírus SARS e MERS.

Além disso, os documentos nacionais são manuais, diretrizes ou recomendações, ou seja, não são obrigações legais dos profissionais de laboratório. A única legislação existente⁽²⁷⁾ trata dos deveres do empregador, por exemplo, devendo o mesmo vedar alguns comportamentos inadequados dos profissionais.

Na pandemia, os laboratórios com poucos recursos necessitaram adaptar soluções seguras e econômicas, mesmo que improvisadas, para garantir o manuseio seguro de amostras clínicas contaminadas com SARS-CoV-2.

Acreditamos na capacidade resiliente dos laboratórios e na adoção das boas práticas destacadas nesta revisão para minimizar o risco de infecção por SARS-CoV-2 entre os profissionais dos laboratórios clínicos.

Abstract

Due to the emergence of SARS-CoV-2 the laboratories had to adapt, as quickly as the pandemic was installed, to safely meet the growing demand for the diagnostic tests. The high potential for virus spread, contact with patients and laboratory handling of samples has become an unprecedented challenge for laboratories. The need for biosafety practices has never been more globally emphasized as in the current circumstances of the pandemic. The purpose of this narrative review was to highlight strategies to prevent contamination by SARS-CoV-2 in clinical laboratories, using as reference the literature published in books, scientific articles, technical guides from health and scientific authorities, and the critical and personal analysis of the author. Some topics that were covered: understanding risks, biosafety strategies, biosafety levels, containment barriers, correct use of personal protective equipment (PPE), disinfection of laboratory areas, safe disposal of waste, and biosafety in the pre-analytical and analytical phases. The orientations are based on limited and often weak evidence arising from opinions, observational studies or extrapolations from the previous epidemics coronaviruses. The highlighted good practices on biosafety were established long before the emergence of COVID-19. However, the pandemic brought up to the laboratory professionals and population in general, good practices that had been forgotten, such as hands hygiene, respiratory etiquette and the correct way of donning and doffing PPE. In the pandemic, laboratories with limited resources had to adapt safe and economical solutions to ensure safety in the clinical laboratory.

Keywords

Biosafety; COVID-19; SARS-CoV-2; pandemic; laboratories; personal protective equipment (PPE)

REFERÊNCIAS

- Gardezi SAH, Ikram A. Application of biosafety principles in Laboratory Analysis of Clinical Samples from patients with COVID-19. J Pak Med Assoc. 2020; 70(Suppl 3)(5):S48-S51. doi:10.5455/JPMA.10.
- Lippi G, Adeli K, Ferrari M, Horvath AR, Koch D, Sethi S, et al. Biosafety measures for preventing infection from COVID-19 in clinical laboratories: IFCC Taskforce Recommendations. Clin Chem Lab Med. 2020;58(7):1053-1062. doi:10.1515/cclm-2020-0633.
- Mourya DT, Sapkal G, Yadav PD, M Belani SK, Shete A, Gupta N. Biorisk assessment for infrastructure & biosafety requirements for the laboratories providing coronavirus SARS-CoV-2/(COVID-19) diagnosis. Indian J Med Res. 2020;151(2 & 3):172-176. doi:10.4103/ijmr.IJMR_763_20.

4. Xie X, Li Y, Chwang AT, Ho PL, Seto WH. How far droplets can move in indoor environments--revisiting the Wells evaporation-falling curve. *Indoor Air*. 2007; 17(3):211-225. doi:10.1111/j.1600-0668.2007.00469.x.
5. Nicas M, Nazaroff WW, Hubbard A. Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens. *J Occup Environ Hyg*. 2005;2(3):143-154. doi:10.1080/15459620590918466.
6. Wang K, Zhu X, Xu J. Laboratory Biosafety Considerations of SARS-CoV-2 at Biosafety Level 2. *Health Secur*. 2020;18(3):232-236. doi:10.1089/hs.2020.0021.
7. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. Classificação de risco dos agentes biológicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. - 3ª ed. - Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 48 p.
8. Organização Pan Americana de Saúde (Brasil). Orientações de biossegurança laboratorial relativa à doença do coronavírus (COVID-19). Orientação provisória 19 de março de 2020.
9. Tan SS, Yan B, Saw S, Lee CK, Chong AT, Jureen R, Sethi S. Practical laboratory considerations amidst the COVID-19 outbreak: early experience from Singapore [published online ahead of print, 2020 Mar 20]. *J Clin Pathol*. 2020;jclinpath-2020-206563. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206563.
10. Center for Disease Control and Prevention. Hierarchy of Controls. Overview [acesso em 17jul2020]. Disponível em <https://www.cdc.gov/niosh/topics/hierarchy/default.html>.
11. Byrd JJ, Emmert E, Maxwell R, Townsend H; ASM Task Committee on the Revision of the 2012 Laboratory Biosafety Guidelines. Guidelines for Biosafety in Teaching Laboratories Version 2.0: A Revised and Updated Manual for 2019. *J Microbiol Biol Educ*. 2019;20(3):20.3.57. Published 2019 Dec 18. doi:10.1128/jmbe.v20i3.1975.
12. Ahmad T, Haroon, Dhama K, Sharun K, Khan FM, Ahmedet I, et al. Biosafety and biosecurity approaches to restrain/contain and counter SARS-CoV-2/COVID-19 pandemic: a rapid-review. *Turk J Biol*. 2020;44(3):132-145. Published 2020 Jun 21. doi:10.3906/biy-2005-63.
13. Organização Mundial da Saúde. Manual de segurança biológica em laboratório - 3ª edição. Genebra, 2004.
14. Ministério do Trabalho e Emprego (Brasil). Portaria nº 877 de 24 de outubro de 2018. Altera a redação da Norma Regulamentadora nº 6. Equipamento de Proteção Individual de 1978 [acesso em 19jul2020]. Disponível em: https://enit.trabalho.gov.br/portal/images/Arquivos_SST/SST_NR/NR-06.pdf.
15. Conselho Federal de Farmácia. Uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) pelos Farmacêuticos e demais Profissionais da Saúde: COVID-19, 2020.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Cartilha de Proteção Respiratória contra Agentes Biológicos para Trabalhadores de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
17. Muñoz-Leyva F, Niazi AU. Common breaches in biosafety during donning and doffing of protective personal equipment used in the care of COVID-19 patients. *Can J Anaesth*. 2020;67(7):900-901. doi:10.1007/s12630-020-01648-x.
18. 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 [published online ahead of print, 2020 Jun 4]. *Clin Chem Lab Med*. 2020;/j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0710/cclm-2020-0710.xml. doi:10.1515/cclm-2020-0710.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Nota Técnica nº 22. Recomendações e alertas sobre procedimentos de desinfecção em locais públicos realizados durante a pandemia da COVID-19 SEI/COSAN/GHCOS/DIRE3. Brasília: Ministério da Saúde; 2020.
20. Bain W, Lee JS, Watson AM, Stitt-Fischer MS. Practical Guidelines for Collection, Manipulation and Inactivation of SARS-CoV-2 and COVID-19 Clinical Specimens. *Curr Protoc Cytom*. 2020;93(1):e77. doi:10.1002/cpcy.77.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). March 18, 2020 [acesso em 20jul2020]. Disponível em <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/lab-biosafetyguidelines.html>.
22. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 222, de 28 de março de 2018. Regulamento as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde e dá outras providências. Diário Oficial da União 29 mar 2018.
23. Loh TP, Horvath AR, Wang CB, Koch D, Lippi G, Mancini N, et al. Laboratory practices to mitigate biohazard risks during the COVID-19 outbreak: an IFCC global survey [published online ahead of print, 2020 Jun 4]. *Clin Chem Lab Med*. 2020;/j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0711/cclm-2020-0711.xml. doi:10.1515/cclm-2020-0711.
24. Marques M, et al. Orientações para boas práticas em alimentação e nutrição hospitalar no enfrentamento da Covid-19 [E-book]. Goiânia: Cegraf UFG, 2020. 49 p.
25. Ministério da Saúde. Diretrizes para diagnóstico e tratamento da COVID-19. Versão 4. 07 de maio de 2020.
26. Hong KH, Lee SW, Kim TS, Huh HJ, Lee J, Kim SY, et al. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. *Ann Lab Med*. 2020;40(5):351-360. doi:10.3343/alm.2020.40.5.351.
27. Ministério do Trabalho e Emprego (Brasil). Norma Regulamentadora (NR) nº 32 de 11 de novembro de 2005. Segurança e saúde no trabalho em serviços de saúde. Diário Oficial da União 16 nov 2005.

Correspondência

Flávia Martinello

Departamento de Análises Clínicas

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

88040-900 – Florianópolis-SC, Brasil

flavia.martinello@ufsc.br

Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil

The laboratory diagnosis of COVID-19 in Brazil

Joseli Maria da Rocha Nogueira¹

Lillian Oliveira Pereira da Silva²

Resumo

Apesar da grande emergência desta pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2 em nosso país e no mundo, várias opções de metodologias diagnósticas têm sido criadas para nos auxiliar na detecção desse agente, contribuindo para evitar a sua disseminação, detectar quem já teve a doença e, em alguns casos, favorecer o tratamento precoce. O diagnóstico sorológico da COVID-19 disponível atualmente detecta a presença de anticorpos, IgA, IgM e IgG, que são proteínas específicas produzidas em resposta a infecções, mostrando então uma resposta imunológica do indivíduo ao vírus. Ressalta-se que o diagnóstico final da Covid-19 deve ser estabelecido pela combinação de vários exames com as informações clínico-epidemiológicas. Os resultados destes testes são importantes também para detectar infecções em pessoas que apresentaram poucos ou nenhum sintoma, e apesar da possibilidade de resultados falsos, seu custo-benefício é bastante positivo frente ao padrão-ouro de diagnóstico que é o RT-PCR, de elevado custo, já que, por ser mais acessível, a sorologia proporciona também uma ideia da epidemiologia global da doença quando ocorre testagem em massa.

Palavras-chave

Diagnóstico laboratorial; COVID; Coronavírus; sorologia

INTRODUÇÃO

O Coronavírus é um RNA-vírus comumente zoonótico, pertencente à família Coronaviridae, conhecida por causar infecções respiratórias, sendo isolado pela primeira vez em 1937 e descrito apenas em 1965. Os dois principais integrantes capazes de causar infecções em humanos são os SARS-CoV e os MERS-CoV, causadores da síndrome respiratória aguda (SARS) e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), respectivamente.⁽¹⁾ Em dezembro de 2019, após um surto de pneumonias de causas desconhecidas na cidade de Wuhan, na China, foi identificada a COVID-19 (do inglês, *coronavirus disease - 2019*). Essa patologia foi declarada como uma pandemia, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em março de 2020, tendo rápida disseminação e contágio.⁽²⁾

Causada pelo SARS-CoV-2, a COVID-19 é uma doença de aspecto clínico variado, podendo se apresentar de forma assintomática até quadros graves levando a óbito. De acordo com a OMS, cerca de 80% dos pacientes com a doença podem ser assintomáticos ou oligossintomáticos, ou seja, apresentarem poucos sintomas, e, aproximadamente, 20% dos casos detectados necessitam de

atendimento hospitalar. Os sintomas podem variar de perda de paladar e olfato, um resfriado comum até uma síndrome gripal. Nesta última, pode haver evolução para um quadro respiratório agudo caracterizado por um estado febril ou febre, associada a dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza, e até uma pneumonia severa,^(2,3) que pode levar ao óbito.

É válido salientar que diversas atitudes são de extrema importância no controle da disseminação do vírus e da própria doença, como fortalecer o organismo por meio de boa alimentação, sono regular e exposição ao sol da manhã. Uma atitude preconizada atualmente é a de sempre usar máscaras e evitar circular nas ruas e/ou em ambientes com grande concentração de pessoas, pois, de acordo com os estudos epidemiológicos, a transmissão da COVID-19 ocorre pelo contato com superfícies contaminadas ou com pessoas infectadas e o tempo de incubação em um recém-contaminado pode ser de até 14 dias. Durante esse período, mesmo que o paciente seja assintomático, já é possível transmitir o vírus para outras pessoas e/ou contaminar o ambiente. Os indivíduos doentes devem permanecer em casa e, caso os sintomas se agravem, procurar a unidade básica de saúde para uma avaliação.⁽⁴⁾

¹Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

²Especialização em Análises Clínicas. Fundação Técnico-Educacional Souza Marques (FTESM). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Instituição: Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 12/08/2020

Artigo aprovado em 27/08/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200007

A partir da avaliação da situação de outros países e diversos estudos, é possível perceber que o sistema de saúde entrará em colapso caso haja um número elevado de contaminados sintomáticos e, por isso, torna-se importante a realização da quarentena preventiva, do distanciamento e do isolamento social, como mostra a Figura 1. Como ainda não existe um tratamento ou vacina efetiva para a COVID-19, achatar a curva de contágio é retardar a velocidade de transmissão do coronavírus, o que evita a ocorrência de muitos infectados em um curto espaço de tempo e, conseqüentemente, reduz o número de óbitos decorrentes da doença.⁽⁵⁾

Com base na forma como essa pandemia está se alastrando, torna-se de extrema importância utilizar metodologias diagnósticas para auxiliar não só na detecção do vírus SARS-CoV-2, contribuindo para evitar a sua dispersão, mas para termos um panorama da disseminação da doença.

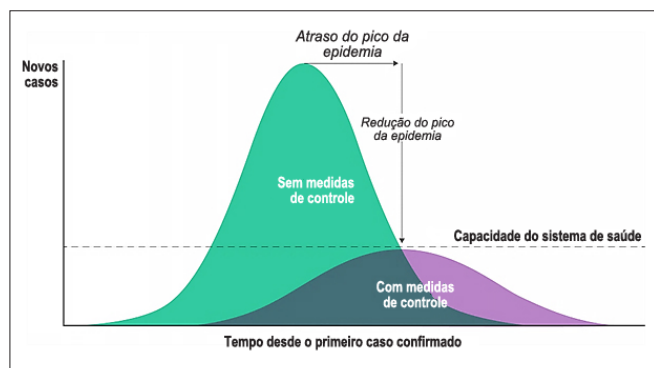


Figura 1. Curva de contágio
Fonte: Damasio, 2020⁽⁵⁾

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho se baseou em uma busca em fontes de dados como o periódico Capes, Google Acadêmico e sites científicos e governamentais, através da associação das palavras-chave "Diagnóstico laboratorial", "COVID", "Coronavírus", "Sorologia" e suas variações em Inglês. A pesquisa foi realizada no período correspondente ao início da pandemia, abrangendo trabalhos de março a agosto de 2020. A seleção dos artigos foi realizada a partir da leitura dos títulos seguida dos resumos. Os trabalhos que apresentavam o enfoque das informações correspondentes ao diagnóstico da COVID-19 foram lidos na íntegra e deram origem aos resultados deste artigo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A infecção por SARS-CoV-2 apresenta três estágios de acordo com a evolução dos sintomas, o que favore-

ce a utilização de diferentes métodos de diagnóstico, como mostra a Figura 2. No primeiro estágio, há a incubação assintomática com ou sem vírus detectável. Já no segundo estágio, tem-se um período sintomático não grave e com a presença de vírus, enquanto que, no último estágio, a carga viral é alta e o paciente apresenta sintomas respiratórios graves.⁽⁶⁾

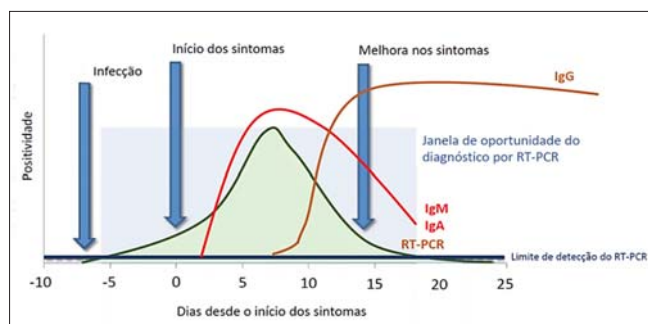


Figura 2. Resultado dos métodos diagnósticos nos estágios da infecção por SARS-CoV-2

Fonte: Lippi et al, 2020⁽⁶⁾

RT-PCR

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o diagnóstico padrão ouro para identificação do vírus SARS-CoV-2 é realizado por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa com amplificação em tempo real, ou RT-PCR, e sequenciamento parcial ou total do genoma viral. As amostras para esta análise podem ser obtidas por meio do aspirado nasofaríngeo (ANF), swab nasal e oral, bem como pela secreção respiratória do trato inferior, como escarro, lavado traqueal ou lavado broncoalveolar. O ideal é que a coleta seja realizada após o surgimento dos sintomas, entre o terceiro e o quinto dias, e, no mais tardar, até dez dias após o ocorrido.^(3,7)

Trata-se de uma técnica muito sensível e específica, caso seja realizada corretamente, evitando resultados errôneos (Figura 3). Caso as amostras sejam coletadas de forma precoce ou tardia, ou seja, antes do período de, no mínimo, três dias antes do surgimento dos sintomas ou após dez dias do surgimento dos mesmos, pode-se obter um falso negativo. O mesmo pode ocorrer com esfregaços insuficientes provenientes da nasofaringe ou amostras contaminadas durante o processamento.⁽⁸⁻¹⁰⁾

Apesar de ser considerado o método mais eficaz de detecção, deve-se ter em mente que o resultado negativo em RT-PCR não descarta totalmente a possibilidade de infecção pelo vírus, sendo recomendado que o resultado seja combinado com observações clínicas, o histórico do paciente e informações epidemiológicas da região. Caso o paciente apresente alta probabilidade de infecção e, ainda assim, o teste seja negativo, é indicado realizá-lo novamente com amostras diferentes.⁽¹⁰⁾

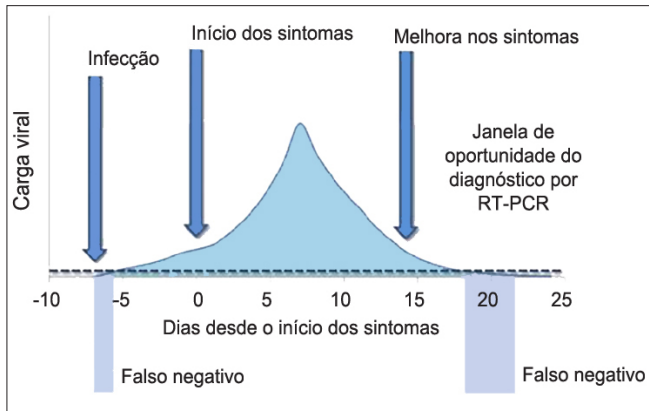


Figura 3. Carga viral estimada pelo método RT-PCR e as fases de desenvolvimento da Covid-19.

Fonte: Lippi et al, 2020⁽⁶⁾ e Pavão et al, 2020.⁽¹⁰⁾

Sorologia

No Brasil, o método sorológico tem sido o mais utilizado para diagnóstico da COVID-19, pelo custo e pela rapidez. Os kits de diagnóstico sorológico da COVID-19 disponíveis atualmente detectam a presença de anticorpos, IgA, IgM e IgG, que são proteínas específicas que expressam uma resposta imunológica do indivíduo frente ao contato com esse vírus. Os anticorpos começam a ser produzidos a partir do 7º dia da doença. Portanto, um resultado negativo não exclui a possibilidade de doença devido à

janela imunológica. Esse teste é realizado a partir de amostras de sangue, soro ou plasma, que deve ser obtida a partir do oitavo dia de sintomas, para que seja considerado o tempo de produção de anticorpos pelo sistema imunológico em quantidade suficiente para detecção.^(8,11) Vários são os ensaios para detecção rápida e qualitativa de anticorpos e existem atualmente quatro tipos principais de técnicas sorológicas para o diagnóstico da COVID-19 disponíveis no Brasil, como mostra a Tabela 1.⁽¹¹⁾

A escolha de pesquisar a Imunoglobulina A (IgA) se deve ao fato de que a IgA, no caso da COVID-19, tem positividade mais precocemente. Além disso, os anticorpos totais e o algoritmo sorológico são exames da nova geração, onde o primeiro apresenta maior sensibilidade e especificidade, apesar de não diferenciar a imunoglobulina, e o segundo é um exame realizado em duas etapas (anticorpos totais e, quando positivo, realiza-se o IgM/IgG), e foi desenhado para se obter a maior acurácia e também diferenciar os tipos de imunoglobulina em casos de COVID-19.⁽¹¹⁾

De acordo com Dias e colaboradores, ainda que na fase aguda da doença não seja possível detectar anticorpos neutralizantes, a detecção de anticorpos IgA parece ser mais sensível que a de IgM (Tabela 2), ambos de fase aguda. Os autores também acreditam que pacientes infectados possam manter seus níveis de IgG por duas semanas.⁽⁴⁾

Tabela 1 - Técnicas sorológicas para o diagnóstico da COVID-19

Exame	Metodologia	Vantagem	Acurácia (vs RT-PCR)	
			Sensibilidade	Especificidade
Sorologia IgM / IgG	Quimioluminescência	Resultados isolados de IgM / IgG	87,2%	96%
Sorologia IgA/IgG	ELISA	IgA apresentando uma sensibilidade mais precoce	95%	96%
Anticorpos totais	Eletroquimioluminescência	Alta sensibilidade	95% -99%	96%
Algoritmo sorológico	Eletroquimioluminescência, Quimioluminescência	Testagem em duas etapas com alta sensibilidade	95% -99%	96%

Fonte: DASA, 2020⁽¹¹⁾

Tabela 2 - Detecção de imunoglobulinas na COVID-19

Imunoglobulina	Positividade (%)	Aparecimento após os sintomas
IgA	92,7	~ 5º dia
IgM	85,4	~ 5º dia
IgG	67-78	10 a 18 dias

Fonte: Dias et al, 2020⁽⁴⁾

Entretanto, alguns estudos recentes sugerem que a maioria dos pacientes contaminados pelo vírus SARS-CoV-2 só começaram a produzir anticorpos contra o mesmo após o período de 7 a 11 dias após a exposição, ainda que alguns pacientes possam desenvolver anticorpos antes desse período. Portanto, assim como no RT-PCR, os testes sorológicos não podem ser utilizados de forma unitária para

identificar a contaminação do indivíduo.⁽¹⁰⁾ A interpretação dos resultados sorológicos e de RT-PCR estão descritos na Tabela 3.

Por outro lado, também há a indicação que os testes sorológicos possam contribuir para o diagnóstico de pacientes hospitalizados com quadro tardio, ainda que um resultado negativo não descarte o diagnóstico, além de auxiliar na avaliação do retorno dos profissionais de saúde ao trabalho, bem como realizar a monitoração epidemiológica da situação, como o percentual de indivíduos expostos e quais desenvolveram anticorpos.⁽¹²⁾

Os testes sorológicos podem ser divididos em dois grupos principais: os testes rápidos e os testes sorológicos propriamente ditos, abordados anteriormente. Os testes rápidos se baseiam na imunocromatografia para IgM e IgG,

Tabela 3 - Interpretação de resultados para COVID-19

Sorologia IgA / IgM	Sorologia IgG	RT-PCR SARS-CoV-2	Interpretação
Não Reagente	Não Reagente	Não detectado	Não há evidência laboratorial de infecção atual ou progressa
		Detectado	Infecção atual
		Não realizado	Não há evidência laboratorial de infecção progressa, infecção atual não pode ser descartada
Reagente ou Indeterminado	Não Reagente	Não detectado	Sugestivo de infecção recente (≥ 7 a 10 dias do início dos sintomas)
		Detectado	Sugestivo de infecção atual (< 7 dias do início dos sintomas)
		Não realizado	Sugestivo de infecção (recente ou atual)
Não Reagente, Reagente ou Indeterminado	Reagente	Não detectado	Infecção recente (≥ 7 a 10 dias do início dos sintomas)
		Detectado	Infecção recente com persistência de detecção da carga viral
		Não realizado	Sugestivo de infecção progressa, porém infecção atual ou recente não pode ser descartada

Fonte: DASA, 2020 [11].

ou seja, ocorre a geração de cor após a reação entre o antígeno e o anticorpo. São testes mais indicados para exames a partir do 10° dia após o início de sintomas, de fácil execução e conseguem dar resultados entre dez e trinta minutos. Esses testes apresentam melhor desempenho em amostras de soro ou plasma quando comparados com amostras de sangue total ou capilar.^(13,14)

Ainda que seja uma técnica rápida, a sorologia apresenta um elevado risco de falso-negativo, pois os resultados podem ter reação cruzada com anticorpos produzidos por outras infecções, pelo uso prévio de vacinas, ou até pela coexistência de outras condições clínicas. Portanto, esses testes devem ser utilizados apenas para triagem e complementariedade de diagnóstico, haja vista que os falsos-negativos podem induzir um indivíduo contaminado a deixar o isolamento domiciliar erroneamente, resultando na disseminação do vírus. A partir disso, sabe-se que, para definir e concluir um diagnóstico de COVID-19 deve-se obter um conjunto de informações clínico-epidemiológicas, exames de RT-PCR e/ou sorologia, exames de imagem como a tomografia computadorizada em casos de pneumonia, entre outros exames complementares.^(4,6,11,14,15)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resposta imune à infecção por SARS-CoV-2, causador da COVID-19, permite a detecção de anticorpos IgA, IgM e IgG em sangue total, soro ou plasma, através de testes sorológicos. Todavia, a janela imunológica pode acabar facilitando a ocorrência de falsos-negativos. A partir disso, o padrão-ouro de diagnóstico da doença é o RT-PCR, que se baseia na amplificação do material genético viral antes mesmo do paciente apresentar sintomas. É

importante frisar que o diagnóstico da COVID-19 não deve ser concluído apenas com um tipo de resultado, seja ele positivo ou negativo, mas sim combinado com outros testes, com a associação das informações clínico-epidemiológicas e exames complementares, para que se evite a disseminação do vírus através do indivíduo contaminado que deixa o isolamento após um único resultado negativo.

Abstract

Despite the great emergence of this pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus in our country and in the world, several options of diagnostic methodologies have been created to assist us in the detection of this agent, helping to prevent spread, detect who has had the disease and, in some cases, help to start early treatment. The serological diagnosis of Covid-19 currently available, detects the presence of antibodies, IgA, IgM and IgG, which are specific proteins produced in response to infections, thus showing an immune response to the virus. We emphasize that the definitive diagnosis of Covid-19 must be established by combining several tests with clinical-epidemiological information. The results of these tests are also important for detecting infections in people who had few or no symptoms, and despite the possibility of false results, its cost-benefit is quite interesting compared to the gold standard of diagnosis which is the high-cost, RT-PCR, since being more accessible, serology also provides an estimate of the global epidemiology of the disease, when mass testing occurs.

Keywords

Laboratory diagnosis; COVID; coronavirus; serology

REFERÊNCIAS

1. Lima CMAO. Informações sobre o novo coronavírus (COVID-19). (Editorial) Radiol Bras. 2020 Mar/Abr;53(2):V-VI.
2. WHO. Global research on coronavirus disease (COVID-19). World Health Organization, mar./2020. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov>. Acesso em: 10 ago. 2020.

3. Ministério da Saúde. Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19). Mar/2020. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 10 ago. 2020.
4. Dias V, Carneiro M, Vidal C, Corradi M, Brandão D, Cunha C, et al. Orientações sobre Diagnóstico, Tratamento e Isolamento de Pacientes com COVID-19. J. Infect. Control, 2020 Abr-Jun;9(2):XX-XX. Disponível em: http://www.abennacional.org.br/site/wp-content/uploads/2020/05/Journal_Infection_Control.pdf. Acesso em: 10 ago. 2020.
5. Damasio K. Com aumento de casos e transmissão comunitária, Brasil desperta para coronavírus. National Geographic, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-1, mar./2020. Disponível em: <https://www.nationalgeographicbrasil.com/cultura/2020/03/com-aumento-de-casos-e-transmissao-comunitaria-brasil-age-contra-coronavirus>. Acesso em: 10 ago. 2020.
6. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Clin Chem Lab Med. 2020;58(7):1070-1076. doi:10.1515/cclm-2020-0285. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0285>. Acesso em: 11 ago. 2020.
7. Cerqueira LCN, et al. Principais Métodos Diagnósticos da COVID-19: recomendações e perspectivas. Saúde coletiva, Brasil, v. 10, n. 54, p. 1-3, abr./2020. Disponível em: <https://doi.org/10.36489/saudecoletiva.2020v10i54p2633-2638>. Acesso em: 10 ago. 2020.
8. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional pela Doença pelo Coronavírus 2019. Vigilância Integrada de Síndromes Respiratórias Agudas. Doença pelo Coronavírus 2019, Influenza e outros vírus respiratórios [Internet]. Brasília (DF): MS, 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/Abril/06/GuiaDeVigiEp-final.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2020.
9. Patel R. Relatório da Cúpula Internacional COVID-19 da Sociedade Americana de Microbiologia: Valor dos testes de diagnóstico para SARS - CoV-2 / COVID-19", mBio, vol. 11, n. 2, mar./2020. . DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00722-20>.
10. Pavão AL, Janotti L, Moura ML, Gouvêa C, Graboiset V. Considerações sobre o diagnóstico laboratorial da Covid-19 no Brasil. Observatório Covid-19 Fiocruz, 2020. Nota técnica. 20p. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/42557>. Acesso em: 10 ago. 2020.
11. DASA. Exames diagnósticos para COVID-19. DASA, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-1, mar./2020. Disponível em: <https://dasa.com.br/exames-covid-sorologia-pcr>. Acesso em: 10 ago. 2020.
12. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Laboratorial. Métodos Laboratoriais para Diagnóstico da Infecção pelo SARS-CoV-2. Disponível em <http://www.sbpc.org.br/wpcontent/uploads/2020/04/MetodosLaboratoriaisDiagnosticoSARS-CoV-2.pdf>.
13. Anvisa. Testes para Covid-19: perguntas e respostas. Novo Coronavírus, Brasil, abr./2020. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/testes-para-covid-19-perguntas-e-respostas/219201. Acesso em: 11 ago. 2020.
14. Dias VMDCH, Carneiro M, Michelin L, Vidal CFL, Costa LATJ, Ferreira CES, et al. Testes sorológicos para COVID-19: Interpretação e aplicações práticas. Journal of infection control, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 1-12, jun./2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Ricardo_Cohen/publication/343084804_316-1337-4-PB/links/5f16275592851c1eff22189c/316-1337-4-PB.pdf. Acesso em: 10 ago. 2020.
15. Zhao W, Zhong Z, Xie X, Yu Q, Jun Liuet. Relation Between Chest CT Findings and Clinical Conditions of Coronavirus Disease (COVID-19) Pneumonia: A Multicenter Study. AJR Am J Roentgenol. 2020; 214(5):1072-1077. doi:10.2214/AJR.20.22976.

Correspondência

Joseli Maria da Rocha Nogueira
Departamento de Ciências Biológicas,
Escola Nacional de Saúde Pública
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)
Rio de Janeiro-RJ, Brasil
joseli@ensp.fiocruz.br

Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 by real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Maria Elizabeth Menezes¹

Lenilza Mattos Lima²

Flávia Martinello²

Resumo

O diagnóstico da COVID-19 está alicerçado na clínica do paciente, nos exames de imagem e no diagnóstico laboratorial. O exame de detecção do ácido nucleico viral por transcrição reversa (RT) seguido da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) foi rapidamente o primeiro método de diagnóstico laboratorial estabelecido e permanece como o padrão ouro. Esta narrativa descritiva é resultado de uma busca referenciada onde o ponto focal foi descrever o diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por RT-PCR. O diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por RT-PCR envolve as etapas de extração do RNA, transcrição reversa para obtenção do DNA complementar e a reação em cadeia da polimerase. A detecção da amplificação do material genético é realizada pela medida de fluorescência emitida. Entre as várias amostras biológicas que podem ser utilizadas, aquela que tem apresentado mais praticidade e precisão é a de *swab* da nasofaringe. A coleta da amostra deve ser, idealmente, realizada até sete dias a partir do início dos sintomas. Quando o SARS-CoV-2 é detectado na RT-PCR, o diagnóstico de COVID-19 é confirmado. No entanto, um único resultado de SARS-CoV-2 não detectado em paciente sintomático não exclui o diagnóstico. O exame não tem apresentado reações cruzadas com outros patógenos respiratórios. Contudo, o exame é caro e demorado, e pode resultar em falso negativo devido ao momento inadequado da coleta da amostra, coleta e manuseio impróprio de amostras e material genético viral insuficiente no sítio de coleta. Lacunas diagnósticas ainda permanecem na triagem de assintomáticos e na detecção de vírus vivos na convalescença.

Palavras-chave

SARS-CoV-2; COVID-19; diagnóstico laboratorial; RT-PCR em tempo real; diagnóstico molecular

INTRODUÇÃO

No fim de 2019, um surto de pneumonia de etiologia indefinida na cidade de Wuhan, província de Hubei na China, foi relatado à Organização Mundial de Saúde (OMS). Subsequentemente, um novo coronavírus (nCoV) foi identificado. O coronavírus-2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), vírus que causa a doença do coronavírus-19 (COVID-19), é o mais novo membro do grupo coronavírus (CoV), família viral que foi descoberta pela cientista June Almeida em 1965. Os CoV foram identificados e assim denominados por apresentar, sob a luz da microscopia eletrônica, uma estrutura externa que lembra a de uma coroa.⁽¹⁾

Os CoV são uma grande família de vírus causadora de doenças como o resfriado comum até doenças mais

graves, como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) e a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS).⁽²⁾

Trata-se de uma família de vírus de RNA que contém pelo menos 39 espécies em 27 subgêneros e é dividida em duas subfamílias: Orthocoronaviridae e Torovirinae. O novo coronavírus pertence à subfamília Orthocoronaviridae, e foi denominado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus de SARS-CoV-2. A subfamília é ainda subdividida em quatro gêneros: α , β , γ e δ . Os α e β -CoV são capazes de infectar mamíferos, incluindo humanos, enquanto que γ e δ -CoV tendem a infectar aves.

O SARS-CoV-2 foi caracterizado como um β CoV, envelopado de RNA de fita simples (+ ssRNA), polaridade positiva e não segmentada, de aproximadamente 30 kb, sendo o maior genoma viral conhecido até o momento. O genoma do SARS-CoV-2 codifica 14 poliproteínas *Open*

¹DNA Análises Laboratório. Florianópolis-SC, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis-SC, Brasil.

Instituições: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); DNA Análises Laboratório. Florianópolis-SC, Brasil.

Recebido em 04/09/2020

Artigo aprovado em 18/09/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200006

Reading Frames (ORF). Na extremidade 5', a ORF1ab é o maior gene e está envolvido na codificação de 14 proteínas não estruturais. Na extremidade 3' estão os genes das proteínas estruturais: E (envolpe); M (membrana); N (nucleocapsídeo) necessário à síntese viral, S (Spike) e HE (hemaglutinina-esterase), que permite a entrada e a infecção da

célula hospedeira (Figura 1A), além dos genes de proteínas acessórias (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8 e ORF10).⁽²⁻⁵⁾

A ordem dos genes do SARS-CoV-2 é 5'-replicase ORF1ab-S-E-M-N-3', ORF3ab, ORF6, ORF7ab, ORF8, ORF9ab e ORF10 e está demonstrada na Figura 1B como 1a, 1b, 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9a, 9b, 10.⁽²⁾

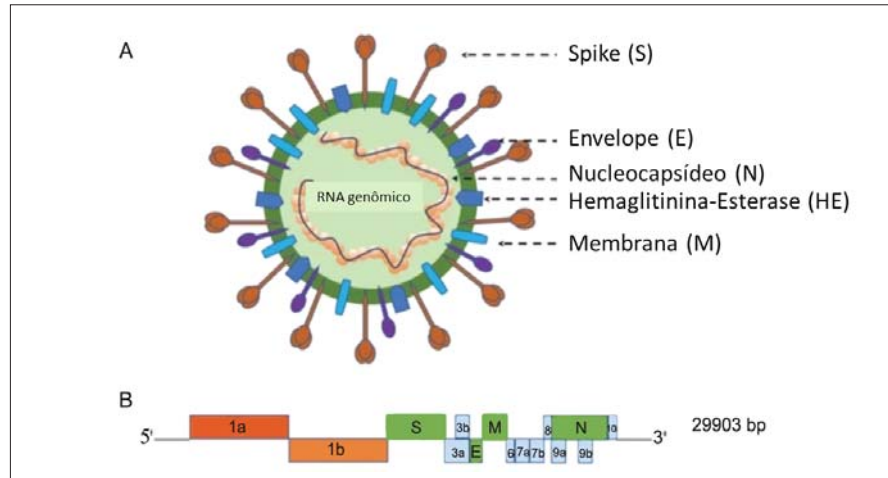


Figura 1. Representação esquemática da partícula viral e do genoma do β -Coronavírus. A: partícula viral; B: genoma viral. Fonte: Jin Y, et al. 2020; adaptado.⁽²⁾

Todos os CoV humanos podem ser de origem zoonótica. Análises filogenéticas demonstraram que o nCoV compartilha 96% de identidade do seu genoma completo com um CoV de morcego, o BatCoV RaTG13, 99% com o genoma do Pangolin-CoV, 79% com o SARS-CoV e 50% com o MERS-CoV, sugerindo a transmissão para humanos após mutações.⁽²⁾ As vias de transmissão do SARS-CoV-2 ocorrem principalmente por gotículas respiratórias e contato com objetos contendo partículas virais. Estudos que encontraram o vírus nas fezes de humanos infectados sugerem também a transmissão fecal-oral. Evidências sugerem que a proteína S do SARS-CoV-2 se liga à enzima

conversora de angiotensina do tipo 2 humana com afinidade de 10-20 vezes maior do que o SARS-CoV.⁽²⁻⁶⁾

Para a replicação viral, existe um tempo entre a adsorção do vírus nas células hospedeiras até a liberação do vírus, isto é, o SARS-CoV-2 não lisa as células. Após a saída da célula, o vírus é adsorvido nas células vizinhas e assim sucessivamente. Ainda não está claro o tempo de replicação viral. Também não está completamente elucidado o tempo da resposta imune e consequente do aparecimento de IgA, IgM e IgG no sangue.⁽⁷⁾ A Figura 2 ilustra o período de detecção tanto do RNA viral quanto dos anticorpos contra o SARS-CoV-2.⁽⁸⁾

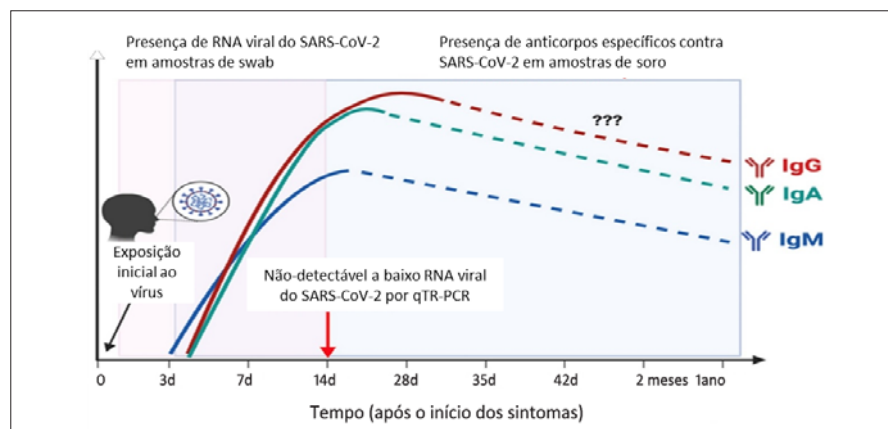


Figura 2. Representação esquemática do período de detecção do RNA viral e dos anticorpos em indivíduos infectados com o SARS-Cov-2. Fonte: Lee CY-P, et al, 2020; adaptado.⁽⁸⁾

Nos últimos vinte anos ocorreram duas epidemias de coronavírus, a SARS em 2002, na China, causando cerca de 8.422 infecções e 916 mortes, e a MERS, responsável por uma epidemia persistente na Península Arábica em 2012, com 862 mortes de 2.506 infectados. Ambas foram associadas às complicações graves do trato respiratório inferior e manifestações extrapulmonares como diarreia, linfopenia, síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e taxas de mortalidade de 11% a 35%, respectivamente.^(3,9,10) O período de incubação do SARS-CoV-2 foi relatado entre três e cinco dias,^(6,11) e os sintomas surgem entre oito e 11,5 dias da infecção.⁽¹¹⁾ Os pacientes infectados com SARS-CoV-2 assintomáticos ou sintomáticos podem transmitir a doença, no entanto, aqueles com COVID-19 grave têm sido considerados com maior potencial de transmissão.⁽²⁾

O diagnóstico da COVID-19, sendo ainda uma doença nova, está alicerçado na clínica do paciente, nos exames de imagem e no diagnóstico laboratorial. Nessa revisão, nós apresentamos o método laboratorial da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para diagnóstico do SARS-CoV-2, discutimos suas características de desempenho e destacamos as fragilidades da capacidade diagnóstica atual.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Neste momento, o diagnóstico laboratorial exerce um papel fundamental tanto para o prognóstico e acompanhamento, bem como para estudos da epidemiologia molecular do SARS-CoV-2. O padrão ouro para isolamento do agente infeccioso da COVID-19, por se tratar de vírus, é a cultura em tecido. Porém, a cultura viral não é prática e leva pelo menos três dias para apresentar os efeitos citopáticos em linhagens celulares, como das células VeroE6. Ainda, esse método requer estrutura laboratorial com nível de biossegurança 3, o qual normalmente não está disponível nas instituições de saúde.⁽¹²⁾

Além disso, os relatos da China corroboram instruções do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) e da OMS quanto à utilização da transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para o diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2.^(4,13,14)

Ao contrário da sorologia, a RT-PCR fornece importantes informações nos estágios iniciais da infecção, pois pesquisa o patógeno diretamente por meio da detecção de seu ácido nucleico quando o objetivo é prevenir a transmissibilidade e os anticorpos ainda não foram produzidos. Permite, então, a detecção precoce e a diferenciação de outras viroses respiratórias, apresentando alta sensibilidade e especificidade, respectivamente.⁽¹⁴⁾

O método de RT-PCR pode ser caseiro (*in house*) ou comprado em conjuntos diagnósticos (*kits*). Há vários pro-

colos de RT-PCR publicados pela OMS e descritos pela China, Estados Unidos, CDC chinês e americano, Alemanha, Hong Kong, Tailândia e Japão. Vários exames foram rapidamente aprovados no Brasil, mas com qualidades diferentes. Até 17 de agosto de 2020, cinquenta empresas já haviam registrado, na Anvisa, *kits* diagnósticos de SARS-CoV-2 por RT-PCR em tempo real, incluído *kits* produzidos no Brasil. Desses, 23 têm registro padrão na Anvisa, ou seja, têm a concessão regular da validade de registro de produtos para saúde de 10 anos. Os outros 27 *kits* têm registro emergencial, ou seja, validade de um ano por não terem apresentado todas as informações necessárias, como a estabilidade. Dos cinquenta *kits* registrados no Brasil, apenas quatro buscam a amplificação de somente um alvo do genoma viral, a maioria (28) busca dois alvos, 16 buscam três alvos e dois buscam quatro alvos. Entre os genes mais pesquisados, a maioria (38) dos *kits* investiga o gene da proteína N, 24 da E, 24 o ORF1ab, 8 da proteína S, entre outros genes.⁽¹⁵⁾

Preparo da amostra e amplificação do material genético viral

Tanto os *kits* quanto os métodos *in house* envolvem as mesmas etapas, que incluem: 1. Extração do RNA, 2. Transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA) e 3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. A detecção da amplificação do material genético é realizada em tempo real pela medida da fluorescência emitida pelo fluoróforo. A seguir, descrevem-se as etapas:

1. A extração do RNA normalmente é realizada com um tampão de lise contendo reagentes como isotiocianato de guanidina e Triton, tanto em extrações manuais e subsequente purificação em colunas quanto em extrações automatizadas.⁽¹⁶⁾ Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado eficiência semelhante de protocolos de RT-PCR que não realizam a extração do RNA, encurtando o tempo de diagnóstico.⁽⁴⁾

2. Consiste na síntese de uma fita de DNA utilizando-se como molde (*template*) uma fita de RNA numa reação catalisada por uma enzima denominada transcriptase reversa. São utilizados *primers* inespecíficos, ou seja, oligonucleotídeos compostos por várias timinas consecutivas (6 a 35), que são anelados às regiões Poli-A (ou *A-Rich*) do RNA, ricas em adeninas. Após esta etapa de 10-15 minutos a 45-50°C, obtém-se o cDNA, que será utilizado na PCR. O *round* de transcrição reversa não altera o número de fitas de RNA ou DNA. Em seguida, a reação permanece por 3-10 minutos a 95°C para desnaturação da RT e do RNA, mas não do cDNA, e ativação da polimerase.^(12,16,17)

3. A amplificação (multiplicação) de trechos específicos do cDNA ocorre alternando-se a temperatura de ensaio

entre: a) desnaturação das cadeias de RNA, mas não de cDNA; b) anelamento dos *primers*, usados para delimitar a sequência a ser amplificada; c) polimerização ou extensão; d) reinício do ciclo.⁽¹⁸⁾

De forma mais detalhada, a transcrição reversa é seguida pela fase de PCR, que consiste em uma etapa de desnaturação de 3-10 segundos a 95°C, durante a qual as fitas de DNA se separam em fitas simples, e uma etapa de hibridação/polimerização de 15-45 segundos a 55-60°C, durante a qual os iniciadores de amplificação (e sondas de detecção) hibridizam com os modelos de DNA de fita simples e permitem que a polimerase replique o modelo, criando DNA de fita dupla. Durante a polimerização bem-sucedida, a sonda é deslocada e hidrolisada, liberando a fluorescência. Este processo é repetido geralmente cerca de 40-45 vezes (ciclos). Uma corrida de RT-PCR em tempo real típica, conforme exemplificado aqui, é concluída em cerca de uma hora e trinta minutos.^(12,16,19)

Entre os reagentes da PCR estão DNA polimerase, íons (Na⁺, Cl⁻, K⁺, entre outros) que otimizam as condições de reação. MgCl₂ é um doador muito estável de íons Mg²⁺, que são cofatores indispensáveis para atividade da enzima DNA polimerase. Alguns tampões contêm ainda detergentes que inibem a formação de dímeros das cadeias enzimáticas, proteínas estabilizantes (albumina sérica bovina) e algumas substâncias que agem na desnaturação da cadeia molde de DNA (Ditiotreitol, β-mercaptoetanol), quebrando as pontes de hidrogênio entre as bases. Os desoxinucleotídeos são a matéria-prima propriamente dita para a síntese das cópias de DNA, são compostos por nucleotídeos (ATP, TTP, CTP, GTP) desoxilados no carbono 5' da desoxirribose. São adicionados pela polimerase complementarmente à fita-mãe numa área delimitada pelos *primers*, que são pequenas sequências de DNA (12 a 35 bases).⁽¹⁸⁾

Diferentemente da PCR convencional, onde os resultados das reações são normalmente visualizados em padrões de bandas obtidos por eletroforese, no método de RT-PCR em tempo real utilizam-se *primers* e dNTPs marcados por compostos fluorescentes. A emissão e detecção de fluorescência ocorrem durante a reação de PCR. Uma fluorescência mínima (eixo y) da fase exponencial de amplificação gênica corresponde ao *threshold*, ou *cut-off*, que é traçado horizontalmente no gráfico, e é utilizado para calcular o limite de ciclo (CT) de cada amostra. O CT corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para o início da amplificação, ou seja, o momento em que a fluorescência emitida ultrapassa a linha do limite. Dessa forma, o CT tem relação inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo presente na amostra. O diferencial da RT-PCR em tempo real, no entanto, é a utilização de termocicladores especiais que, além de realizar os ciclos de temperatura, possuem leitores de fluorescência que fornecem

dados sobre a quantidade de DNA formada durante a reação. Cada nucleotídeo fluoresce em um determinado comprimento de onda que é captado pelo leitor do termociclador e os dados são analisados por um programa.⁽²⁰⁾ Os resultados são gráficos como o da Figura 3.

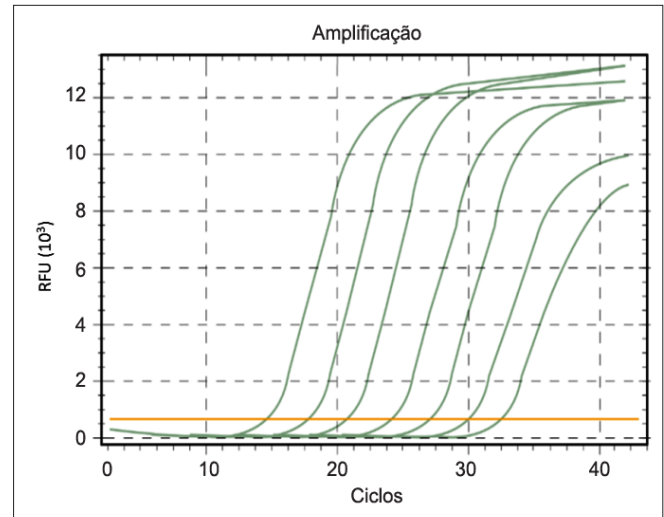


Figura 3. Gráfico de quantificação de produtos de PCR em termociclador do tipo tempo real. O gráfico mostra quantidades absolutas (unidade relativa de fluorescência - RFU) de DNA em função do número de ciclos. Fonte: Viasure SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit, 2020; adaptado.⁽²¹⁾

Um CT menor do que 35 tem sido considerado como vírus detectado (positivo) e maior do que 40 vírus não detectado (negativo). Entre 35 e 40 necessita de confirmação.^(19,22) Quando dois alvos, por exemplo, gene da proteína N e ORF1ab, ou E e S, ou S e RdRp (gene da RNA polimerase dependente de RNA), ou outras combinações são detectadas, o SARS-CoV-2 deve ser considerado detectado pelo laboratório.⁽²²⁾ Quando, de dois, apenas um alvo é detectado recomenda-se a repetição do exame e assim é recomendada a amplificação de vários genes alvo.⁽¹³⁾

A etapa mais demorada do exame diagnóstico é a extração de RNA, no entanto, já há automação que extrai até 96 amostras por hora. A maioria dos equipamentos de PCR em tempo real realiza 96 análises simultaneamente, mas há equipamentos que analisam de 48 a 1.536 amostras em uma única corrida analítica.⁽¹⁶⁾

Um controle interno negativo (intratubo) deve ser utilizado, o qual não apresentará crescimento na curva de fluorescência. Um controle interno positivo também deve ser utilizado.⁽¹³⁾ RNA genômico ou transcrito *in vitro* não são recomendados para controle interno devido à baixa estabilidade.⁽²³⁾

Embora estejamos em um período de emergência, há a necessidade urgente de procedimentos de validação e verificação dos métodos de RT-PCR em tempo real nos laboratórios. Para tal, as amostras devem ter a mesma

matriz daquelas que serão analisadas. No mínimo dez amostras negativas (preferencialmente anteriores à pandemia) e dez amostras controle comerciais ou amostras residuais de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 devem ser utilizadas para avaliar se a *performance* atende à precisão e exatidão dos resultados descrita nas instruções do fabricante.⁽²³⁾

Amostras clínicas

O diagnóstico do SARS-CoV-2 pode ser realizado em uma variedade de amostras clínicas, incluindo lavado broncoalveolar, biópsia pulmonar, escarro, esfregaço (*swab*) nasofaríngeo, esfregaço orofaríngeo, fezes, urina, sangue e até saliva.^(14,24,25) Os estudos têm relatado que o lavado broncoalveolar é a melhor amostra, no entanto, a coleta não é prática.^(22-24,26) O escarro também é uma ótima amostra para o diagnóstico laboratorial da COVID-19, seguida dos *swabs* nasofaríngeo e orofaríngeo.^(13,22,26) Contudo, este último tem sido pouco recomendado e os autores não destacaram que na COVID-19 a tosse normalmente não é pro-

ductiva, o que também dificulta a coleta do escarro. Por fim, a amostra que tem apresentado mais praticidade e precisão é a de *swab* da nasofaringe.^(14,19,24,25) Entretanto, cabe destacar o risco de transmissão do SARS-CoV-2 aos profissionais de saúde durante a coleta de amostras do trato respiratório, especialmente do inferior.⁽²⁵⁾ Para evitar inconsistências, os autores sugerem analisar diferentes amostras simultaneamente,⁽²⁶⁾ o que aumenta os custos do diagnóstico laboratorial da COVID-19.

Como o intervalo de tempo para o pico da carga viral na COVID-19 ainda é desconhecido, o tempo ótimo para a coleta das amostras biológicas para o diagnóstico da infecção não foi estabelecido.⁽¹³⁾ Um estudo retrospectivo em Wuhan com 301 pacientes com COVID-19 e 1.113 resultados de RT-PCR indicou a mediana de 16 dias entre o início dos sintomas e o primeiro resultado positivo.⁽¹⁹⁾ Porém, tem sido recomendada a coleta até sete dias a partir do início dos sintomas para obtenção de resultados mais confiáveis.⁽²⁷⁾ A Figura 4 apresenta a taxa de positividade da RT-PCR para SARS-CoV-2 a partir do início dos sintomas.⁽¹⁹⁾

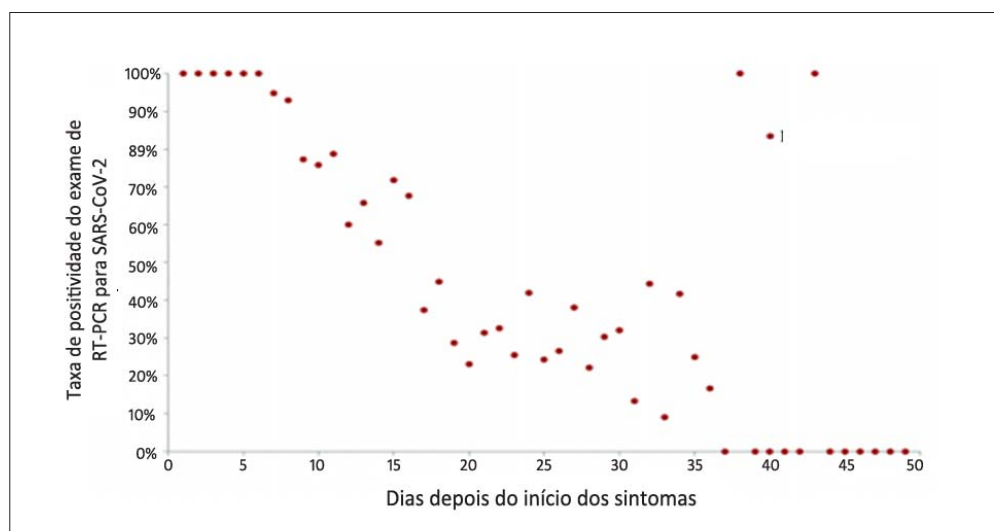


Figura 4. Taxa de positividade da RT-PCR para SARS-CoV-2 a partir do início dos sintomas.

Fonte: Xiao AT, et al, 2020; adaptado.⁽¹⁹⁾

De acordo com a história natural da COVID-19 e a cinética viral diferente entre os sítios anatômicos, a amostragem contribui para resultados falso negativos. Por exemplo, os *swabs* utilizados devem ser de poliéster ou dacron.⁽¹³⁾ Resultados falso negativos também podem ser gerados por presença de inibidores de amplificação na amostra, pouca quantidade de vírus, coleta ou manuseio inadequados da amostra e longo tempo de transporte.^(13,16)

Um estudo chinês descreveu que 3% de 167 pacientes com evidência de COVID-19 na tomografia de tórax inicialmente apresentaram RT-PCR negativa. Posteriormente, o *swab* de todos os pacientes converteu a RT-PCR

positivo em um intervalo médio de cinco a sete dias.⁽²⁸⁾ Outro estudo publicado com uma série de casos demonstrou que os resultados de pacientes com coletas de *swab* de orofaringe e nasofaringe em diferentes momentos variou ao longo do tempo. Foram observados casos de pacientes com o vírus detectado em um dia e não detectado em amostra coletada em outro dia, e que apresentaram o vírus detectado novamente em uma terceira amostra.⁽²⁹⁾ Portanto, eventualmente, a coleta de múltiplas amostras, de locais e tempo diferentes durante a evolução da doença, pode ser necessária para o diagnóstico da COVID-19.

Ainda, para evitar a degradação do RNA viral na amostra e garantir o desempenho da RT-PCR em tempo real, após a coleta de *swab*, a amostra deve ser imersa em um meio de transporte, ou tampão de lise ou solução salina estéril. As amostras devem ser armazenadas entre 2°C e 8°C por até 72 horas depois da coleta. Caso o exame não seja realizado nesse curto período de tempo, a amostra deve ser armazenada pelo menos a -70°C.⁽⁴⁾

Interpretação

Um resultado positivo para SARS-CoV-2 apresenta elevado valor preditivo positivo e confirma o diagnóstico de COVID-19, mesmo sem sintomatologia. Mitchell et al.⁽²³⁾ propuseram o seguinte comentário para laudos com resultados de SARS-CoV-2 não detectado: "Esse exame foi realizado para detectar os genes "X" e "Y" do SARS-CoV-2 pelo método de amplificação do ácido nucleico. Um resultado não detectado não exclui a possibilidade de infecção pelo SARS-CoV-2, uma vez que a coleta inadequada da amostra e a baixa carga viral podem resultar na presença de ácido nucleico viral abaixo da sensibilidade analítica."

Portanto, um único resultado não detectado na RT-PCR para SARS-CoV-2 em paciente sintomático não exclui o diagnóstico da COVID-19, possui baixo valor preditivo negativo e a retestagem pode ser considerada.^(13,14) Dois resultados negativos em 24 horas indicam a cura da COVID-19.⁽³⁰⁾ No entanto, esse protocolo não é recomendado, pois não altera a conduta clínica caso ainda haja sinais e sintomas. A clínica continua soberana e os exames são complementares.

Vários fatores como coleta inadequada da amostra, tipo de amostra biológica, tempo decorrido entre a coleta e o início dos sintomas, e insuficiente ou oscilação da carga viral podem influenciar o resultado do exame.⁽²⁹⁾ Sempre que houver discordância com o quadro clínico epidemiológico, o exame de RT-PCR deve ser repetido em outra amostra do trato respiratório. A sensibilidade do método RT-PCR é variável entre diferentes amostras biológicas para detecção do SARS-CoV-2. Um estudo que avaliou 1.070 amostras de 250 pacientes com COVID-19 observou os seguintes valores de sensibilidade para as diferentes amostras testadas por RT-PCR: lavado broncoalveolar 93%, escarro 72%, *swab* nasal 63%, *swab* de orofaringe 32%, fezes 29%, sangue 1% e urina 0%.⁽³¹⁾

Uma revisão encontrou substancial variação sobre o período de infecção. O período mediano de casos assintomáticos foi de 6,5-9,5 dias. O período pré-sintomático variou de 1-4 dias entre os estudos. O tempo médio entre o início dos sintomas e dois resultados de SARS-CoV-2 não detectados foi de 13,4 dias, mas esse período é menor se incluídos casos menos graves e crianças. A dura-

ção média estimada entre o início dos sintomas e a alta hospitalar foi de 14,1 dias.⁽³⁰⁾

Em pacientes moderada e severamente afetados pela COVID-19 foi estimada a detecção do RNA viral de SARS-CoV-2 em amostras de *swab* de nasofaringe e de fezes por 45 e 49 dias depois do início dos sintomas, respectivamente.⁽³²⁾ Assim, é importante destacar que a persistência do exame positivo não significa necessariamente que o paciente ainda esteja infectado. O período em que os pacientes permanecem infectantes ainda não está totalmente esclarecido e a utilização dos resultados dos exames para liberação do paciente do isolamento respiratório deve ser avaliada criteriosamente.

Evidências recentes mostram que a eficiência diagnóstica de muitos dos *kits* comerciais de RT-PCR em tempo real para SARS-CoV-2 pode ser menor do que a ideal, ou seja, <100%.⁽¹³⁾ Um grande estudo na China demonstrou até 41% de falso negativos nos resultados, com relatos de indivíduos com falso negativos por até duas semanas. Tal fato prejudica a contenção da pandemia, visto que esses indivíduos continuam transmitindo a doença por desconhecê-la.⁽¹⁴⁾

Desafios do diagnóstico molecular

A RT-PCR pode ser operada em larga escala e os resultados estão geralmente disponíveis dentro de algumas horas a dois dias.⁽¹⁴⁾ No entanto, a falta de reagentes no mercado e a alta demanda de amostras têm causado sobrecarga aos laboratórios e atraso na liberação de resultados.

Considerando a morosidade de uma RT-PCR em tempo real, uma alternativa de exame molecular é a amplificação isotérmica mediada por alça (LAMP) também precedida de transcrição reversa. Esse método não envolve diferentes temperaturas e então pode ser realizado em equipamentos menos sofisticados, possibilitando que o exame seja realizado fora do laboratório como teste laboratorial remoto (*point of care testing*). Normalmente utiliza-se a LAMP com quatro a seis genes alvo para garantir a sensibilidade e especificidade sob condição isotérmica a 63°C-65°C. O método é menos sensível a inibidores, pode ser realizado com amostras minimamente extraídas e o tempo de análise é menor, entre 30-40 minutos.^(5,16,17,33) Nenhum exame desse tipo foi registrado na Anvisa até o momento.

Contudo, as técnicas moleculares exigem pessoal com conhecimento e treinamento técnico especializado para operar sofisticados instrumentos,^(17,25) são de alto custo,⁽⁴⁾ e o laboratório deve atender aos requisitos de nível 2 ou mais de biossegurança.^(14,34)

Até o momento, vários protocolos de RT-PCR para detecção do SARS-CoV-2 com diferentes eficiências de detecção foram publicados.⁽²⁵⁾ As diferentes *performances*

podem estar associadas a protocolos variados ou à estrutura secundária do RNA viral ou à sua estabilidade.⁽¹⁶⁾

No Brasil, as primeiras avaliações dos métodos de RT-PCR identificaram divergências de resultados entre marcas, alvos genéticos, protocolos, pontos de corte e laboratórios. Em uma rodada de controle externo da qualidade com 39 laboratórios participantes, 5,1% de resultados falso positivos foram observados em métodos *in house* e 10,3% de resultados falso negativos em *kits* comerciais. Para a amostra definida previamente como reagente, nenhum laboratório relatou resultado como inconclusivo. No entanto, para a amostra definida previamente como não reagente, os métodos *in house* apresentaram 7,7% dos resultados como inconclusivos. Dos 27 laboratórios que utilizaram método *in house*, 7,4% apresentaram resultados falso positivos, 7% falso negativos e 11% inconclusivos quando a amostra era reagente. Entre os *kits* comerciais não foi verificado falso positivo, no entanto, houve 33% de falso negativos.⁽³⁵⁾

Além disso, o Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) também tem feito um monitoramento pós-mercado da qualidade de dispositivos para diagnóstico *in vitro* da COVID-19 por meio de análises laboratoriais. Entre os poucos exames moleculares avaliados até o momento, todos estavam em conformidade.⁽³⁶⁾

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas junto com outras sociedades científicas também se uniram para avaliar *kits* de diagnóstico para SARS-CoV-2 disponíveis no mercado brasileiro. Apenas cinco de RT-PCR foram avaliados até o momento, e destes apenas um não apresentou resultados compatíveis com o especificado pelo fabricante.⁽³⁷⁾

Embora erros diagnósticos sempre tenham ocorrido de forma individualizada, as suas consequências amplificam junto com a pandemia da COVID-19. Um resultado falso positivo não só leva a tratamento desnecessário, mas pode causar problemas sociais, pois pode prejudicar a força de trabalho disponível para enfrentar esta pandemia se atribuído a profissional de saúde. No entanto, um resultado falso negativo pode contribuir potencialmente para uma maior disseminação do SARS-CoV-2 na comunidade.^(13,14)

Os erros analíticos específicos da RT-PCR podem envolver um mau funcionamento do equipamento, ensaios não validados de forma adequada, falha não detectada pelo controle da qualidade, variação na sequência do RNA viral (até 15 de fevereiro de 2020, 104 cepas já haviam sido identificadas), exame realizado fora da janela diagnóstica, má harmonização de *primers* ou sondas e anelamento não específico, qualidade dos reagentes utilizados e outros problemas técnicos.^(13,14)

Ensaio moleculares podem ser inibidos por substâncias presentes no material biológico, caso estes sejam

coextraídos com os ácidos nucleicos. Esses inibidores interferem diretamente nas reações enzimáticas, o que diminui a sensibilidade dos exames, podendo até mesmo promover resultados falso negativos. Substâncias inibidoras de PCR como IgG, hemoglobina e lactoferrina podem ser coextraídas do sangue, soro ou plasma. Hormônios e antivirais (aciclovir) também podem afetar a amplificação. O componente mais crítico da urina é a ureia, que degrada as polimerases. Polissacarídeos, sais e ácidos biliares e glicolipídios coextraídos das fezes também são descritos como inibidores. Os inibidores podem ser também introduzidos na amostra durante a fase pré-analítica e/ou purificação dos ácidos nucleicos, o que inclui pó das luvas, sais (cloreto de sódio e cloreto de potássio), detergentes (SDS) e moléculas orgânicas (etanol, isopropanol e fenol).⁽³⁸⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O SARS-CoV-2 trouxe um grande desafio para a ciência, bem como para os pacientes, médicos e laboratórios. O diagnóstico laboratorial, o tratamento e vacinas têm sido desenvolvidos principalmente em outros países por terem experienciado a circulação do vírus primeiro. Ainda, a cada dia uma batalha da guerra contra a COVID-19 é vencida. Demonstrando a importância da medicina laboratorial, a pandemia tem destacado o valor das tecnologias já disponíveis para diagnósticos cada vez mais rápidos e também para a produção de vacinas. Lacunas diagnósticas ainda permanecem na triagem de pessoas assintomáticas que estão na fase de incubação do vírus, bem como na detecção da eliminação de vírus vivos durante a convalescença para auxiliar na orientação de flexibilização ou encerramento de isolamento social.

Abstract

The diagnosis of COVID-19 is based on the patient's clinic, imaging tests and laboratory diagnosis. The detection of viral nucleic acid by reverse transcription (RT) followed by real-time polymerase chain reaction (PCR) was quickly the first established laboratory diagnosis method and remains the gold standard. This descriptive narrative is a result of a referenced search where the focal point was to describe the laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-PCR. The laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-PCR involves the RNA extraction, reverse transcription to obtain complementary DNA, and the polymerase chain reaction steps. The detection of genetic material amplification is carried out by measuring the emitted fluorescence. Among the various biological samples that can be used, the one that has shown the most practicality and precision is the nasopharyngeal swab. Sample collection should be performed, ideally, within 7 days from the symptoms onset. When SARS-CoV-2 is detected by RT-PCR, the diagnosis of COVID-19 is confirmed. However, a single result of undetected SARS-CoV-2 in a symptomatic patient does not exclude the diagnosis. The test has not shown cross-reactions with common respiratory pathogens. However, the test is costly and time-consuming, a false-negative result may arise due to inadequate sample collection time, improper samples collection and handling, and insufficient viral genetic material at the collection site. Diagnostic

gaps remain on asymptomatic patients screening, and in the detection of live viruses in convalescence.

Keywords

SARS-CoV-2; COVID-19; laboratory diagnosis; real time RT-PCR; molecular diagnosis

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Coronavírus: o que você precisa saber e como prevenir o contágio. [Acesso em 01 de set de 2020]. Disponível em: <https://coronavirus.saude.gov.br/>
2. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*. 2020;12,372. doi:10.3390/v12040372.
3. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020;92(4):424-432. doi: 10.1002/jmv.25685.
4. Oliveira BA, Oliveira LC, Sabino EC, Oka TS. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2020; 62:e44. doi: 10.1590/s1678-99462020 62044.
5. Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez-Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC, et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;98(1):115094. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.115094.
6. Chan KW, Wong VT, Tang SCW. COVID-19: An Update on the Epidemiological, Clinical, Preventive and Therapeutic Evidence and Guidelines of Integrative Chinese-Western Medicine for the Management of 2019 Novel Coronavirus Disease. *Am J Chin Med*. 2020;48(3):737-762. doi:10.1142/S0192415X20500378.
7. Menezes ME. Diagnóstico laboratorial do coronavírus (SARS-CoV-2) causador da COVID-19. COVID-19, Informes Técnicos 30 de março de 2020. [Acesso em 02 de set de 2020]. Disponível em: <https://www.sbac.org.br/blog/2020/03/30/diagnostico-laboratorial-do-coronavirus-sars-cov-2-causador-da-covid-19/>
8. Lee CY-P, Lin RTP, Renia L, Ng LFP. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Front Immunol*. 2020;11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00879.
9. Ashour HM, Elkhatib WF, Rahman MM, Elshabrawy HA. Insights into the Recent 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) in Light of Past Human Coronavirus Outbreaks. *Pathogens*. 2020;9(3):186. doi: 10.3390/pathogens9030186.
10. Bertolini D. COVID-19. Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. COVID-19, Informes Técnicos 6 de abril de 2020. [Acesso em 02 de set de 2020]. Disponível em: <https://www.sbac.org.br/blog/2020/04/06/covid-19/>
11. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 2020;172(9):577-582. doi: 10.7326/M20-0504.
12. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*. 2020;58(5):e00310-20. doi: 10.1128/JCM.00310-20.
13. Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn*. 2020;20(5):453-454. doi: 10.1080/14737159.2020.1757437.
14. Younes N, Al-Sadeq DW, Al-Jighefee H, Younes S, Al-Jamal O, Daas HI, et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020;12(6):582. doi: 10.3390/v12060582.
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Produtos para diagnóstico in vitro de COVID-19 regularizados [Acesso em 17 de ago de 2020]. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13/-/asset_publisher/WvKkx2fhjdjM2/content/prioridade-de-analise-em-situacoes-de-aumento-da-seguranca-de-uso-dos-produt-1/33912?redirect=/produtos-para-a-saude&inheritRedirect=true.
16. Bustin SA, Nolan T. RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. *Intl J Mol Sci*. 2020; 21(8), 3004. doi: 10.3390/ijms21083004.
17. Lu R, Wu X, Wan Z, Li Y, Jin X, Zhang C. A Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Intl J Mol Sci*. 2020;18;21(8):2826. doi: 10.3390/ijms21082826.
18. Vieira DP. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. São Paulo:2011 [Acesso em 10 de ago de 2020]. Disponível em: <http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf>.
19. Xiao AT, Tong YX, Gao C, Zhu L, Zhang YJ, Zhang S. Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: A descriptive study. *J Clin Virol*. 2020;127:104346. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104346.
20. Vieira DP. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. São Paulo:2011 [Acesso em 10 de ago de 2020]. Disponível em: <http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula3.pdf>.
21. Viasure SARS-CoV-2 Real Time PCR Detection Kit. Kabbla clinical DX [Acesso em 02 de set de 2020]. Disponível em: <https://kabila.mx/pruebasespeciales/biologia-molecular/sars-cov-2-coronavirus-viasure/>
22. Liu R, Huan H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta*. 2020; 505:172-175. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.009.
23. Mitchell SL, Georg KS, Rhoads DD, Butler-Wu SM, Dharmarha V, McNult P, et al. Understanding, Verifying, and Implementing Emergency Use Authorization Molecular Diagnostics for the Detection of SARS-CoV-2 RNA. *J Clin Microbiol*. 2020;58(8):e00796-20. doi: 10.1128/JCM.00796-20.
24. Bwire GM, Majigo MV, Njiro BJ, Mawazo A. Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*. 2020. doi: 10.1002/jmv.26349.
25. Li C, Ren L. Recent progress on the diagnosis of 2019 Novel Coronavirus. *Transbound Emerg Dis*. 2020;67(4):1485-1491. doi: 10.1111/tbed.13620.
26. Yang Y, Yang M, Shen C, Wang F, Yuan J, Li J, et al. Laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *MedRxiv preprint*. 2020. doi:10.1101/2020.02.11.20021493.
27. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Métodos Laboratoriais para Diagnóstico da Infecção pelo SARS-CoV-2. [Acesso em 10 de ago de 2020]. Disponível em: <http://www.sbpcc.org.br/wp-content/uploads/2020/04/MetodosLaboratoriaisDiagnosticoSARS-CoV-2.pdf>.
28. Xie X, Zhong Z, Zhao W, Zheng C, Wang F, Liu J. Chest CT for Typical Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing. *Radiology*. 2020;296(2), E41-E45. doi: 10.1148/radiol.20200343.
29. Li Y, Yao L, Li J, Chen L, Song Y, Cai Z, et al. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J Med Virol*. 2020;92(7):903-908. doi: 10.1002/jmv.25786.
30. Byrne AW, McEvoy D, Collins AB, Hunt K, Casey M, Barber A, et al. Inferred duration of infectious period of SARS-CoV-2: rapid scoping review and analysis of available evidence for asymptomatic and symptomatic COVID-19 cases. *BMJ Open*. 2020;10(8):039856. doi:10.1136/bmjopen-2020-039856.

31. 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):1843-1844. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
32. Sun J, Xiao J, Sun R, Tang X, Liang C, Lin H, et al. Prolonged Persistence of SARS-CoV-2 RNA in Body Fluids. *Emerg Infect Dis*. 2020; 26(8):1834-1838. doi: 10.3201/eid2608.201097.
33. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(6):773-779. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001.
34. Organização Pan Americana de Saúde (Brasil). Orientações de biossegurança laboratorial relativa à doença do coronavírus (COVID-19). Orientação provisória 19 de março de 2020.
35. ControlLab. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Primeira avaliação de ensaio de proficiência pioneiro para todos os métodos de detecção do SARS-CoV2. [Acesso em 17 de ago de 2020]. Disponível em https://controllab.com/destaques/2020/arquivos/Relatorio_EP_SARSCOV2.pdf.
36. Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS). Monitoramento pós-mercado da qualidade de dispositivos para diagnóstico in vitro da COVID-19: análises laboratoriais. [Acesso em 17 de ago de 2020]. Disponível em <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZjZjMDE0NGUtn2M4Yi00NTZiLTliN2MtMzA2YTZkMjcyNDRhIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWwzZjMtNGQzNS04MGM3LWl3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9>.
37. Teste COVID 19. Programa de avaliação de kits de diagnóstico para SARS-CoV-2. [Acesso em 17 de ago de 2020]. Disponível em <https://testecovid19.org/avaliacoes/>
38. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica/medicina laboratorial: fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais. 1 ed. Barueri, SP: Manole; 2018.

Correspondência

Maria Elizabeth Menezes
Laboratório DNA Análises
Av. Trompowski, 299 – Centro
Florianópolis-SC, Brasil
melmenezes2001@yahoo.com

A COVID-19 e o laboratório de hematologia: uma revisão da literatura recente

A COVID-19 and the clinical hematology laboratory: review

Marcos Kneip Fleury

Resumo

A COVID-19 se manifesta principalmente como uma infecção do trato respiratório. Entretanto, uma enorme quantidade de estudos mostra características de uma enfermidade sistêmica com repercussões nos sistemas cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, neurológico, hematopoiético e imunológico. Os estudos realizados em vários centros de pesquisa na China, Europa e nos Estados Unidos indicam que os resultados laboratoriais podem fornecer à equipe clínica muitos marcadores prognósticos de grande utilidade. O impacto no sistema hematopoiético e na hemostasia é evidenciado por alterações importantes na quantidade de linfócitos, granulócitos e plaquetas além de alterações no processo de coagulação. Estes parâmetros podem ser monitorados e têm efeito prognóstico na evolução da doença podendo ajudar a identificar pacientes que necessitem de cuidados intensivos. Em resumo, a COVID-19 apresenta alterações importantes do sistema hematopoiético estando frequentemente associada a um estado de hipercoagulabilidade. A avaliação cuidadosa dos índices laboratoriais no início da doença e durante a evolução podem ajudar o corpo clínico a formular uma abordagem de tratamento adaptada à situação além de permitir atenção especial àqueles pacientes que apresentam maior necessidade.

Palavras-chave

COVID-19; Coronavírus; SARS-CoV-2; hemograma; coagulopatia de consumo; Síndrome Respiratória Aguda Grave

INTRODUÇÃO

A pandemia em curso, a COVID-19, teve origem em Wuhan, província de Hubei, China, em dezembro de 2019.

O agente etiológico é um novo coronavírus (SARS-CoV-2) de presumida origem zoonótica com similaridade estrutural aos vírus responsáveis pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome - SARS*) e pela Síndrome Respiratória do Oriente Médio (*Middle East Respiratory Syndrome - MERS*).

Como a SARS e a MERS, a infecção pelo coronavírus se manifesta com mais frequência com sintomas respiratórios. Entretanto, pequena parte dos infectados evolui para síndrome do desconforto respiratório agudo/dano alveolar difuso.

Embora esteja bem documentado que a COVID-19 se manifeste principalmente como uma infecção do trato respiratório, dados emergentes indicam que deva ser considerada uma doença sistêmica que envolve múltiplos sistemas, incluindo sistema cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, neurológico, hematopoiético e imunológico.⁽¹⁾

Além de seu papel central no diagnóstico da COVID-19, o laboratório clínico fornece informações críticas aos clínicos sobre prognóstico, curso da doença e resposta à terapia.⁽²⁾

Com base em estudos realizados na China e em outros centros de pesquisa da Europa e Estados Unidos, os resultados laboratoriais podem fornecer à equipe clínica muitos marcadores prognósticos de grande utilidade. Na maioria dos estudos, as informações até agora analisadas estão baseadas em resultados de uma quantidade limitada de dados e devem ser validados com estudos adicionais. Mesmo assim, os resultados disponíveis estabelecem claramente o laboratório de hematologia clínica como um parceiro importante na triagem e no manejo dos pacientes afetados.⁽³⁾

LINFOPENIA

A COVID-19 é uma infecção sistêmica com impacto significativo no sistema hematopoiético e na hemostasia. A linfopenia pode ser considerada um achado laboratorial cardinal, com importante potencial prognóstico.⁽⁴⁾

Professor Associado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.
Assessor Científico do Programa Nacional de Controle de Qualidade - PNCQ.

Instituição: Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 15/07/2020
Artigo aprovado em 04/08/2020
DOI: 10.21877/2448-3877.20200003

Durante o curso da doença, a avaliação longitudinal da dinâmica da contagem de linfócitos e dos marcadores inflamatórios, como a lactato desidrogenase (LDH), a proteína C-reativa (PCR) e os níveis de interleucina 6 (IL-6), podem ajudar a identificar casos com pior prognóstico e indicar a pronta intervenção com o objetivo de melhorar a evolução e atingir a recuperação de uma parcela maior de pacientes.⁽⁵⁾

Durante o período de incubação, que geralmente varia de 1 a 14 dias, e durante a fase inicial da doença, quando apenas sintomas inespecíficos estão presentes, a contagem de leucócitos e linfócitos no sangue periférico é normal ou ligeiramente reduzida.

Após a viremia, o SARS-CoV-2 começa então a afetar principalmente os tecidos que expressam altos níveis da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), incluindo os pulmões, o coração e o trato gastrointestinal.⁽³⁾

Após o início dos primeiros sintomas, há um aumento nas manifestações clínicas da doença com um desenvolvimento pronunciado de mediadores inflamatórios e citocinas, que tem sido caracterizado como uma "tempestade de citocinas". Neste momento, uma linfopenia (absoluta e relativa) significativa se torna evidente.⁽⁶⁾

A linfopenia, definida como uma contagem absoluta de linfócitos (CAL) abaixo de $1,0 \times 10^9/L$, é um achado comum em pacientes com a COVID-19 e pode ser explicada como uma resposta imune defeituosa ao vírus.⁽⁴⁻¹⁰⁾

O monitoramento desses parâmetros hematológicos pode ajudar a identificar pacientes que podem precisar de cuidados na UTI. Uma CAL que se aproxima de uma linfopenia grave (abaixo de $0,6 \times 10^9/L$) pode ser considerada um dos indicadores de admissão precoce na UTI.⁽¹⁰⁾

Alguns estudos mostraram que a linfopenia foi mais intensa naqueles pacientes que necessitaram de tratamento intensivo do que no grupo em que o curso da doença foi mais brando.

Em uma recente metanálise, foi observado que 35% a 75% dos pacientes desenvolveram linfopenia e que esta foi uma característica frequente identificada entre os pacientes que foram a óbito.⁽¹¹⁾

Em crianças, a linfopenia é muito menos comum, como demonstrado em um estudo chinês, no qual a linfopenia foi identificada em apenas 3% dos pacientes pediátricos. Esta é uma característica muito particular da COVID-19, pois contrasta com outras infecções virais semelhantes, como a SARS, na qual a linfopenia foi um achado muito mais comum em crianças.⁽¹²⁾

Pacientes com evolução mais grave apresentam anormalidades laboratoriais mais importantes (incluindo linfopenia e leucopenia) do que aqueles com doença mais branda. Embora sejam necessárias mais pesquisas sobre a etiologia subjacente, vários fatores podem contribuir para a linfopenia associada ao COVID-19.^(4,13,14)

Alguns estudos sugerem que a diminuição substancial no número total de linfócitos indica que o coronavírus poderia afetar as células imunes e inibir, de certa forma, a função imune celular.⁽¹³⁾

Isto pode ser explicado pela expressão do receptor ECA2 pelos linfócitos. Desta forma, haveria a infecção direta do SARS-CoV-2 a estas células, levando-as a lise.⁽¹⁵⁾

Além disso, a infecção pelo coronavírus causa resposta sustentada de citocinas, a tempestade de citocinas, levando a uma alta frequência de doenças imunológicas e mortalidade.⁽¹⁶⁾ Essa resposta de citocinas é caracterizada por níveis marcadamente aumentados de interleucinas, principalmente IL-6, IL-2, IL-7, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), Interferon- γ e fator de necrose tumoral (TNF), todos capazes de promover apoptose linfocitária.⁽⁴⁾

Adicionalmente, a ativação substancial de citocinas pode estar associada à atrofia dos órgãos linfoides, incluindo o baço, prejudicando ainda mais a renovação dos linfócitos. A acidose láctica coexistente, que pode ser mais proeminente entre pacientes com câncer, aumenta o risco de complicações na COVID-19 e também pode inibir a proliferação de linfócitos.⁽⁴⁾

Os linfócitos e suas subpopulações desempenham um papel importante na manutenção da função do sistema imunológico. Tal como acontece com doenças imunes e outras doenças infecciosas, as infecções por vírus também podem levar à desregulação nos níveis destas subpopulações.⁽¹⁷⁾

Quando comparados a indivíduos saudáveis, os pacientes com COVID-19 apresentam significativa diminuição de linfócitos totais e as subpopulações de células T CD4 e CD8, células B e NK. Os pacientes com casos mais graves apresentam linfócitos totais significativamente mais baixos assim como células T CD4, CD8 e células B. Em pacientes responsivos, os linfócitos totais, células T CD8 e células B aumentam, acompanhando a melhora do quadro clínico.⁽⁹⁾

A presença de linfócitos reativos pode ocorrer, de modo geral, apresentando heterogeneidade morfológica. Entretanto, alguns relatos destacam a presença de alterações do tipo linfoplasmocitoide e também de grandes linfócitos granulares (GLG).⁽¹⁸⁾

NEUTRÓFILOS

Os dados sobre neutrofilia ainda não foram profundamente abordados na literatura. Os estudos disponíveis sugerem que a neutrofilia é uma expressão da tempestade de citocinas e do estado hiperinflamatório, que desempenham um papel importante na fisiopatologia da COVID-19 e de infecções relacionadas, como a SARS.^(9,15)

Existem relatos mostrando que a neutrofilia é comum em pacientes tratados na UTI durante a hospitalização e

que, provavelmente, estaria relacionada à infecção bacteriana associada.^(8,10)

Notavelmente, os pacientes de UTI tendem a desenvolver neutrofilia durante a hospitalização, mostrando níveis médios de neutrófilos superiores aos observados naqueles que não necessitam de cuidados intensivos, sendo a neutrofilia associada ao aumento do risco de morte.^(10,18)

De forma geral, os neutrófilos mostram núcleo hiposegmentado, em alguns casos com cromatina pré-apoptótica e citoplasma hipergranular, por vezes com áreas basofílicas hipogranulares. Esse dimorfismo parece estar relacionado a granulopoiese acelerada e desordenada, associada à hiperinflamação. Essas anomalias morfológicas geralmente precedem o aumento de linfócitos reativos.^(2,19)

Um número maior de neutrófilos e um número menor de linfócitos, ou seja, o aumento da razão neutrófilos/linfócitos (RNL) foi observado no grupo de pacientes com evolução mais grave em comparação ao grupo com clínica mais branda.⁽²⁰⁾

A RNL tem sido considerada como um marcador confiável em casos de inflamação e infecção sistêmica e é estudado como um preditor de infecção bacteriana, inclusive das síndromes respiratórias e de pneumonia.⁽²¹⁾

De acordo com os achados de Wang et al., vários pacientes com COVID-19 apresentam aumento na contagem de neutrófilos e queda na contagem de linfócitos durante a fase grave, indicando distúrbios importantes e condição crítica nos casos mais graves da infecção.⁽²²⁾

TROMBOCITOPENIA

As plaquetas participam ativamente da resposta imune além de desempenharem papel importante na hemostasia, coagulação, manutenção da integridade vascular, angiogênese, imunidade inata, resposta inflamatória, biologia tumoral, etc. Mudanças em seu número e atividade estão intimamente relacionadas a uma grande variedade de doenças.

As infecções virais são frequentemente associadas a trombocitopenia, e muitos vírus como o HIV, influenza, dengue e o vírus da hepatite C foram encontrados no interior das plaquetas.

Os dados clínicos obtidos do surto de pandemia de H1N1 de 2009 indicam que muitos dos pacientes que necessitaram de internação em unidades de terapia intensiva apresentaram trombocitopenia. Essa observação foi ainda mais pronunciada em pacientes que sucumbiram à infecção, sugerindo que, durante infecção viral grave, a diminuição do número de plaquetas estaria relacionada a uma pior evolução clínica.⁽²³⁾

As plaquetas são produzidas por megacariócitos maduros na medula óssea, e muitos estudos têm mostrado

que uma variedade de citocinas, incluindo a trombopoietina (TPO), IL-3, IL-6, IL-9, IL-11 e fator estimulador de células tronco (SCF), podem estimular a produção de megacariócitos. Os valores absolutos de plaquetas e linfócitos podem ser usados como indicadores sensíveis no monitoramento de infecções e inflamações.⁽²⁴⁾

No momento da admissão, a maioria dos pacientes com COVID-19 apresenta linfocitopenia, trombocitopenia, e a leucopenia foi observada em 33,7% dos casos. Essas anormalidades hematológicas foram mais marcantes entre os pacientes mais graves.⁽⁵⁾

Um dos trabalhos chineses mostrou que o nível de linfócitos no momento da admissão hospitalar está diretamente relacionado ao prognóstico. Os pacientes mais velhos, com menor número de linfócitos e plaquetas, apresentaram quadros mais graves e permaneceram mais tempo no hospital.

Leucopenia, neutropenia e um aumento na proporção de linfócitos não são significativamente alterados em pacientes com infecções virais mais comuns, mas estes parâmetros se mostram muito alterados na rotina hematológica na COVID-19.⁽²⁴⁾

Vários estudos mostram que, nas infecções graves, algumas características imunológicas do paciente ou outras doenças são responsáveis pela trombocitopenia secundária. A coagulação intravascular disseminada (CID) e a púrpura trombótica trombocitopênica (PTT), sempre caracterizadas pelo rápido declínio plaquetário, são exemplos destas condições.⁽¹⁹⁾

A observação de alguns pacientes demonstrou inicialmente um aumento de plaquetas seguido de sua brusca diminuição, principalmente nos casos mais graves. Além disso, os pacientes com aumento significativo de plaquetas e com idade mais avançada tiveram internações hospitalares mais longas. Portanto, especulou-se que as alterações nas plaquetas no curso do tratamento pudessem estar correlacionadas com a progressão e prognóstico do COVID-19. Qu et al. mostraram que entre trinta pacientes hospitalizados com COVID-19 aqueles que apresentaram um pico na contagem de plaquetas durante o curso da doença tiveram piores resultados.⁽²⁴⁾

As possíveis causas de alterações plaquetárias em pacientes com COVID-19 foram analisadas da seguinte forma:

(a) o Coronavírus seria capaz de invadir diretamente células hematopoiéticas ou células do estroma da medula óssea, levando à inibição hematopoiética.

(b) Estudos anteriores mostram que o pulmão pode ser um dos órgãos onde os megacariócitos maduros liberam plaquetas e que a trombocitopenia em pacientes com infecção por SARS-Cov-2 pode estar associada diretamente ao dano pulmonar.^(24,25)

Extensas lesões alveolares estão presentes em pacientes com COVID-19 e SARS, sendo os danos aos tecidos

dos pulmonares induzidos pela infecção viral e também pelo alto fluxo de oxigênio imposto pelos respiradores artificiais. A lesão do tecido pulmonar e das células endoteliais pulmonares pode levar à ativação, agregação e retenção de plaquetas no pulmão e à formação de trombo no local lesionado. Esta situação pode levar à depleção de plaquetas e megacariócitos, resultando em diminuição da produção de plaquetas e aumento do consumo.⁽²⁴⁻²⁶⁾

Vários estudos sugerem que a trombocitopenia está significativamente associada à gravidade da doença. Embora exista uma grande heterogeneidade entre os valores obtidos nesses estudos, todos apontam que uma queda considerável no número de plaquetas foi observada especialmente nos não sobreviventes.⁽²⁵⁾

A trombocitopenia é característica em pacientes gravemente enfermos e geralmente sugere uma grave descompensação fisiológica, bem como a possibilidade de desenvolvimento de coagulopatia intravascular, evoluindo frequentemente para a coagulação intravascular disseminada (CID).⁽²⁵⁾

COAGULAÇÃO

Os distúrbios da coagulação são relativamente frequentes entre os pacientes com COVID-19, especialmente entre aqueles com doença grave. Em um estudo retrospectivo multicêntrico, realizado nos primeiros dois meses da epidemia, 46,4% dos pacientes com infecção confirmada apresentaram aumento dos valores de dímero D ($\geq 0,5$ mg/L), sendo os resultados mais altos observados nos casos mais graves.⁽⁴⁾

Em um outro estudo retrospectivo na China foi demonstrado que os níveis de dímero D e de tempo de protrombina (TP) apresentavam valores mais elevados no momento da admissão hospitalar naqueles pacientes que precisaram de maiores cuidados e de tratamento intensivo. A dinâmica dos resultados do dímero D durante a evolução da infecção pode refletir a gravidade do quadro, e o aumento de seus níveis está associado a resultados adversos em pacientes com pneumonia.^(6,9,27)

De modo geral, os pacientes com infecção pelo Coronavírus apresentam os parâmetros de coagulação alterados sugerindo um quadro de sepse ou CID. O TP e o dímero D têm sido considerados como indicadores úteis do prognóstico e da gravidade da COVID-19.⁽²⁸⁾

Em um estudo com 183 pacientes, o TP, TTPA, fibrinogênio, antitrombina III (AT III), produtos de degradação da fibrina (PDF) e dímero D foram medidos consecutivamente durante duas semanas de internação. A mortalidade registrada deste grupo foi de 11,5% e o grupo dos não sobreviventes demonstrou, no momento da admissão, níveis significativamente mais altos de dímero D e de PDF além de TP e TTPA mais longos quando comparados ao grupo

de sobreviventes. Ainda em relação aos não sobreviventes, os níveis de fibrinogênio e AT III apresentaram-se significativamente reduzidos enquanto que os níveis de dímero D e PDF foram marcadamente elevados. Estes achados sugerem a ativação da coagulação, a geração desregulada de trombina e a fibrinólise.^(1,29)

Entre os pacientes com pneumonia por coronavírus, o aumento do TP foi associado ao aumento do risco de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), enquanto que os níveis aumentados de dímero D foram significativamente associados ao aumento do risco de SDRA e morte.⁽¹⁸⁾

De acordo com os critérios de diagnóstico da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH) para o diagnóstico da CID, 71,4% dos pacientes que não sobreviveram à pneumonia associada a COVID-19 tiveram diagnóstico confirmado. Entre os sobreviventes, apenas um paciente teve o diagnóstico de CID confirmado. Esses achados demonstram a enorme importância do monitoramento laboratorial regular nestes pacientes.^(29,30)

O tempo médio para a manifestação da CID foi de quatro dias (variação: 1-12 dias) a partir da internação. Em um estudo prospectivo, avaliando-se o perfil de coagulação de pacientes com COVID-19, os níveis de PDF, dímero D e fibrinogênio foram marcadamente mais altos que os observados entre pacientes saudáveis. Além disso, pacientes mais graves apresentaram valores mais altos de dímero D e PDF do que aqueles com manifestações mais leves.⁽²⁷⁾ Este quadro sugere que os parâmetros de coagulação durante o curso da pneumonia por Coronavírus estão significativamente associados ao prognóstico.⁽²⁹⁾

A CID foi identificada na maioria das mortes. Pacientes que apresentam infecção por vírus podem evoluir para sepse associada à disfunção orgânica. A sepse está bem estabelecida como uma das causas mais comuns de CID, que se inicia quando monócitos e células endoteliais são ativados ao ponto de liberação de citocinas, com expressão do fator tecidual e secreção do fator von Willebrand. A circulação de trombina livre, não controlada pelos anticoagulantes naturais, pode ativar plaquetas e estimular a fibrinólise.⁽³¹⁾

O risco de tromboembolismo venoso (TEV) em pacientes hospitalizados com COVID-19 é uma questão emergente. A taxa de TEV sintomático em pacientes hospitalizados na fase aguda da doença aumenta em até 10%. A imobilização prolongada, a desidratação, o estado inflamatório agudo, a presença de outros fatores de risco cardiovascular ou doença cardiovascular, história prévia de TEV e trombofilia genética clássica, como a mutação heterozigótica do fator V Leiden, são comorbidades comuns em pacientes COVID-19 hospitalizados, que potencialmente podem aumentar o risco de TEV.⁽⁵⁾

A possibilidade de ativação e ou dano de células endoteliais devido à ligação do vírus ao receptor ACE2 pode aumentar ainda mais o risco de TEV. A liberação de uma grande quantidade de mediadores inflamatórios e o uso de hormônios e imunoglobulinas em pacientes graves podem levar a um aumento da viscosidade do sangue. Além disso, ventilação mecânica, cateterismo venoso central ou cirurgia podem induzir ao dano endotelial vascular. A combinação de todos os fatores acima pode levar à ocorrência de trombose venosa profunda (TVP) ou até à possibilidade de embolia pulmonar (EP) letal devido à migração de trombo.

Assim, diante desse risco de TEV, a aplicação da tromboprolifaxia farmacológica é obrigatória em pacientes hospitalizados com COVID-19.⁽⁶⁾

As heparinas de baixo peso molecular (HBPM) ou a heparina não fracionada (HNF) devem ser preferidas aos anticoagulantes orais diretos devido a possíveis interações medicamentosas com os tratamentos antiviral e antibacteriano concomitantes.⁽³⁰⁾

Além disso, também é importante prestar atenção ao risco de TEV em pacientes assintomáticos ou ambulatoriais com infecção leve por COVID-19. O diagnóstico precoce de EP em pacientes COVID-19 com manifestações clínicas de deterioração súbita da oxigenação, dificuldade respiratória ou hipotensão é de grande importância para a melhoria dos resultados clínicos.^(5,27,29)

Existem quatro aspectos importantes no tratamento de pacientes com COVID:

1) Diagnóstico e acompanhamento precoces da CID, aplicando-se o escore ISTH (contagem de plaquetas, TP, fibrinogênio, dímero D, antitrombina III e monitoramento da atividade da proteína C), que pode determinar o prognóstico e orientar o suporte intensivo mais adequado;

2) Identificação de pacientes de alto risco, hospitalizados ou no ambulatório;

3) A otimização do regime de tromboprolifaxia sendo a HBPM o medicamento de primeira linha;

4) As propriedades anti-inflamatórias da HBPM podem apresentar um benefício adicional em pacientes com COVID 19 além da possibilidade da integração de outros tratamentos antitrombóticos, como antitrombina e trombo-modulina recombinantes.⁽⁶⁾

Em conclusão, o processo de coagulação sanguínea em pacientes com COVID-19 parece estar claramente alterado. Mais especificamente, verificou-se que os valores do dímero D, produtos de degradação da fibrina e fibrinogênio aumentaram significativamente enquanto que a AT III foi significativamente menor. Ainda mais importante, verificou-se que o dímero D e o PDF são especialmente preditivos da progressão da doença; portanto, seu monitoramento de rotina se apresenta como um marcador confiável da evolução do quadro.⁽²⁷⁾

MARCADORES DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

Nos últimos anos, alguns biomarcadores de inflamação sistêmica, incluindo a sepse, tornaram-se disponíveis nos principais analisadores de sangue como parte do hemograma completo ou como parâmetros medidos no modo de pesquisa. Entre estes novos parâmetros estão a expressão de CD64 de neutrófilos, volume celular médio de neutrófilos e monócitos, fração imatura de granulócitos, índice delta de neutrófilos e a amplitude da variação de tamanho dos monócitos (MDW). É concebível que muitos desses marcadores possam ser úteis na identificação de pacientes com risco de sepse bacteriana secundária, embora ainda não existam estudos que comprovem sua eficácia nesse momento. Uma exceção é o MDW (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA), que foi relatado como aumentado em quase todos os pacientes infectados com COVID-19, principalmente naqueles com os piores sintomas clínicos, de acordo com dados recentemente relatados em uma revisão.⁽⁷⁾ Entretanto, estes dados do MDW devem ser interpretados com cautela, uma vez que a presença de linfócitos reativos em pacientes positivos para COVID-19 pode resultar em um MDW falsamente elevado.

Outra aplicação potencial dos dados derivados do hemograma seria o uso de fórmulas como a relação de neutrófilos/linfócitos (RNL), relação de plaquetas/linfócitos (RPL) e relação de monócitos/linfócitos (RML) atuando como adjuvantes para avaliar a extensão da inflamação. Embora ainda não existam estudos mais aprofundados, envolvendo um número maior de pacientes, Qin et al. relataram um aumento na RNL em pacientes com doença grave em comparação com aqueles com curso mais branda.^(2,20)

A relação plaquetas/linfócitos no momento do pico plaquetário emergiu como um fator prognóstico independente associado a hospitalização prolongada em um dos estudos. Foi sugerido que uma alta relação plaquetas/linfócitos poderia indicar uma tempestade de citocinas mais pronunciada devido à maior ativação plaquetária.

Considerada como um novo índice de inflamação, a RPL reflete principalmente o nível de inflamação sistêmica. Estudos anteriores confirmaram que a RPL está intimamente relacionada a tumores, diabetes, doença coronariana e doenças do tecido conjuntivo. Além disso, o aumento da PLR está relacionado ao tamanho do tumor, infiltração de linfonodos, metástase e ao prognóstico, podendo ser usada como potencial indicador inflamatório para o diagnóstico de pneumonia.⁽²⁴⁾

As plaquetas circulam em sua forma inativa, podendo ser ativadas rapidamente no local da lesão vascular ou em resposta às citocinas pró-inflamatórias ou fatores infecciosos. A ativação das plaquetas por esse mecanismo,

mesmo sem danos vasculares, indica novas funções plaquetárias, como participação nos processos de inflamação e regulação imune.

Os linfócitos são as principais células imunoativas do corpo humano, e sua contagem representa um marcador precoce de estresse fisiológico e inflamação sistêmica. A liberação de fator 4 plaquetário pode promover a formação de linfócitos, e a presença de plaquetas ativadas aumenta a adesão de linfócitos ao endotélio, promovendo, assim, sua migração para locais de inflamação. A vantagem da utilização da RPL é que este marcador se relaciona à agregação plaquetária e à reação inflamatória e talvez seja mais valiosa na previsão de várias inflamações do que a contagem de plaquetas ou linfócitos isoladamente.⁽²⁴⁾

De acordo com análises anteriores, o RPL foi proposto como um indicador que é capaz de refletir a gravidade da inflamação durante o tratamento. Ao se compararem as alterações da RPL durante o tratamento, verificou-se que quanto maior o RPL maior o tempo de internação hospitalar.

Portanto, especulou-se que as alterações na proporção de plaquetas/linfócitos no sangue periférico durante o tratamento pudessem refletir a progressão da doença e o prognóstico dos pacientes com COVID-19. Quanto maior a PLR mais grave a tempestade de citocinas, e quanto maior a permanência no hospital pior o prognóstico.^(24,32)

A atividade pró-inflamatória das plaquetas é mediada também por sua interação com os demais leucócitos em circulação, seguida pela liberação de citocinas e quimioquinas durante o processo inflamatório.^(32,33)

CONCLUSÕES

Em resumo, a COVID-19 apresenta alterações importantes do sistema hematopoético estando frequentemente associada a um estado de hipercoagulabilidade. A avaliação cuidadosa dos índices laboratoriais no início da doença e durante a evolução podem ajudar o corpo clínico a formular uma abordagem de tratamento adaptada à situação além de permitir atenção especial àqueles pacientes que apresentam maior necessidade.

Medidas preventivas para trombofilaxia e a identificação precoce de complicações potencialmente letais, incluindo CID, resultam em melhores resultados e provavelmente reduzirão a taxa de mortalidade geral entre os pacientes infectados sem comorbidades significativas.

A vigilância contínua e o monitoramento laboratorial dos pacientes desde o início das manifestações clínicas são lições importantes que estamos aprendendo ao tratar de uma doença nova, sistêmica e com aspectos fisiopatológicos muito característicos.^(6,7,18,26,29)

Abstract

COVID-19 manifests itself mainly as an infection of the respiratory tract. However, a huge number of studies show characteristics of a systemic disease with repercussions on the cardiovascular, respiratory, gastrointestinal, neurological, hematopoietic and immunological systems. Studies carried out in various research centers in China, Europe and the United States indicate that laboratory results can provide the clinical team with many useful prognostic markers. The impact on the hematopoietic system and hemostasis is evidenced by important changes in the amount of lymphocytes, granulocytes and platelets, in addition to changes in the coagulation process. These parameters can be monitored and have a prognostic effect on the evolution of the disease and can help to identify patients who need intensive care. In summary, COVID-19 presents important changes in the hematopoietic system and is frequently associated with a state of hypercoagulability. Careful assessment of laboratory indexes at the onset of the disease and during evolution can help the clinical staff to formulate a treatment approach adapted to the situation, in addition to allowing special attention to those most severe patients.

Keywords

Coronavirus infections; hematology; blood cell count; disseminated intravascular coagulation; Severe Acute Respiratory Syndrome

REFERÊNCIAS

1. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020 Mar 28;395(10229): 1033-34. doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
2. Frater JL, Zini G, d'Onofrio G, Rogers HJ. COVID-9 and the clinical hematology laboratory. *Int J Lab Hematol*. 2020 Jun;42 Suppl 1:11-18. First published:20 April 2020 <https://doi.org/10.1111/ijlh.13229>.
3. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
4. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-1720. doi:10.1056/NEJMoa2002032. Epub 2020 Feb 28.
5. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, Kastritis E, Sergentanis TN, Politou M, et al. Hematological findings and complications of COVID-19. *Am J Hematol*. 2020;95(7):834-847. doi:10.1002/ajh.25829.
6. Li T, Lu H, Zhang W. Clinical observation and management of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):687-690. doi: 10.1080/22221751.2020.1741327.
7. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1063-1069. doi: 10.1515/cclm-2020-0240.
8. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Erratum in *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):496. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30252-X. Epub 2020 Jan 30.
9. Fan BE, Chong VCL, Chan SSW, Chong VCL, Chan SSW, Lim GH, et al. Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. *Am J Hematol*. 2020 Apr 27. doi: 10.1002/ajh.25847.
10. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, Song S, Ma Z, Mo P, Zhang Y, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis*. 2020 May 11;221(11):1762-1769. doi: 10.1093/infdis/jiaa150.
11. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1131-1134. doi: 10.1515/cclm-2020-0198.

12. Henry BM, Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in children with novel coronavirus disease 2019. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(7):1135-1138. doi:10.1515/cclm-2020-0272 [Epub ahead of print].
13. Mardani R, Ahmadi Vasmehjani A, Zali F, Nasab SDM, Kaghazian H, Kaviani M, et al. Laboratory Parameters in Detection of COVID-19 Patients with Positive RT-PCR; a Diagnostic Accuracy Study. *Arch Acad Emerg Med.* 2020;8(1):e43. Published 2020 Apr 4.
14. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):507-513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
15. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020 Feb 24;12(1):8. doi: 10.1038/s41368-020-0074-x.
16. Channappanavar R, Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin Immunopathol.* 2017 Jul;39(5):529-539. doi: 10.1007/s00281-017-0629-x.
17. Chan MH, Wong VW, Wong CK, Chan PKS, Chu CM, Hui DSC, et al. Serum LD1 isoenzyme and blood lymphocyte subsets as prognostic indicators for severe acute respiratory syndrome. *J Intern Med* 2004; 255:512-8. doi:10.1111/j.1365-2796.2004.01323.x.
18. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. [published online ahead of print, 2020 Mar 13]. *JAMA Intern Med.* 2020;180(7):1-11. doi:10.1001/jamainternmed.2020.0994.
19. Zini G, Ramundo F, Bellesi S, d'Onofrio G. Morphological anomalies of circulating blood cells in COVID-19 infection. *Am J Hematol.* 2020 Jul;95(7):870-872. doi: 10.1002/ajh.25824.
20. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248. Epub ahead of print.
21. Berhane M, Melku M, Amsalu A, Enawgaw B, Getaneh Z, Asrie F. The role of neutrophil to lymphocyte count ratio in the differential diagnosis of pulmonary tuberculosis and bacterial community-acquired pneumonia: a cross-sectional study at Ayder and Mekelle Hospitals, Ethiopia. *Clin Lab* 2019; 65(4).doi: 10.7754/Clin.Lab.2018.180833.
22. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. [published online ahead of print, 2020 Feb 7]. *JAMA.* 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585.
23. Jenne CN, Kubers P. Platelets in inflammation and infection. *Platelets.* 2015;26(4):286-292. doi:10.3109/09537104.2015.1010441.
24. Qu R, Ling Y, Zhang YH, Wei LY, Chen X, Li XM, et al. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. [published online ahead of print, 2020 Mar 17]. *J Med Virol.* 2020;10.1002/jmv.25767. doi:10.1002/jmv.25767.
25. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature.* 2017;544(7648):105-109. doi:10.1038/nature21706.
26. Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2020 Jul;506:145-148. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.022.
27. Han H, Yang L, Liu R, Liu F, Wu KL, Li J, et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clin Chem Lab Med.* 2020 Jun 25;58(7):1116-1120. doi: 10.1515/cclm-2020-0188.
28. Perlman S. Another decade, another coronavirus. *N Engl J Med.* 2020;382(8):760-762. doi:10.1056/NEJMe2001126.
29. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost* 2020 Apr;18(4): 844-847.doi.org/10.1111/jth.14768.
30. Thachil J, Tang N, Gando S, Falanga A, Cattaneo M, Leviet M, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost* 2020 May;18(5): 1023-26. doi: 10.1111/jth.14810.
31. Kitchens CS. Thrombocytopenia and thrombosis in disseminated intravascular coagulation (DIC). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009;240-6. doi:10.1182/asheducation-2009.1.240.
32. Rayes J, Bourne JH, Brill A, Watson SP. The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation. *Res Pract Thromb Haemost.* 2019;4(1):23-35. Published 2019 Oct 17. doi:10.1002/rth2.12266.
33. Behrens K, Alexander WS. Cytokine control of megakaryopoiesis. *Growth Factors.* 2018;36(3-4):89-103. doi:10.1080/08977194.2018.1498487.

Correspondência

Marcos Kneip Fleury*Faculdade de Farmácia**Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)**Av. Carlos Chagas Filho, 373 – Cidade Universitária**Rio de Janeiro-RJ, Brasil**mkfleury@ufrj.br*

Hemostasia e COVID-19: fisiopatologia, exames laboratoriais e terapia anticoagulante

Hemostasis and COVID-19: pathophysiology, laboratory tests and anticoagulant therapy

Anna Paula de Borba Batschauer¹

Heric Witney Jovita²

Resumo

A pandemia COVID-19 é uma emergência na sociedade atual, afetando países e suas populações em diversos níveis, bem como é uma ameaça a sistemas de saúde de todo o mundo. Compreender a relação entre os mecanismos fisiopatológicos da infecção pelo SARS-CoV-2 e o sistema de coagulação se tornou um importante instrumento para pesquisadores e trabalhadores das áreas da saúde no mundo inteiro, de modo que estratégias eficazes possam ser traçadas e seguidas para a recuperação de pacientes acometidos pela doença. O presente artigo caracteriza-se como uma revisão da literatura sobre a homeostasia na COVID-19 por meio da pesquisa e análise em bases de dados eletrônicas. Observou-se que a ocorrência de eventos trombóticos e alterações nos parâmetros da coagulação em pacientes com a COVID-19 é descrita em diversos estudos, e o uso de medicamentos anticoagulantes já é uma alternativa para a diminuição da letalidade do vírus em determinados casos. Além disso, o Dímero-D surge como um marcador do prognóstico da doença, sugerindo a ligação entre o estado hipercoagulável da doença, decorrente da inflamação aguda, e sua taxa de letalidade.

Palavras-chave

COVID-19; coagulação intravascular disseminada; anticoagulantes; Dímero-D

INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 é um dos membros pertencentes à família Coronaviridae e do grupo dos betacoronavírus do qual também fazem parte os vírus SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) e MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*). O SARS-CoV-2 é o terceiro vírus, após o SARS e o MERS, a ser descrito como um agente zoonótico causador de doença respiratória em humanos pertencente à família dos coronavírus.⁽¹⁾ A doença, de caráter respiratório e agudo, provocada pelo SARS-CoV-2, foi denominada de *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19).⁽²⁾

Esta síndrome respiratória aguda, denominada como COVID-19, foi identificada inicialmente na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China, em dezembro de 2019 e propagou-se por todos os continentes.⁽³⁾ No Brasil, o maior problema de saúde pública declarado pelo Ministério da Saúde (MS), que atuou ao Centro de Operações de Emergência (COE) na elaboração de um plano de contingência, e em fevereiro de 2020, a infecção hu-

mana pelo novo COVID-19 foi declarada Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN).⁽⁴⁾

Além dos achados clínicos e laboratoriais encontrados na COVID-19, alterações cardiovasculares e anormalidades nos parâmetros de coagulação também foram descritas na doença. Apesar dos fundamentos destas alterações não estarem totalmente esclarecidos, estudos recentes apresentam correlação entre elevações de marcadores de coagulação e o aumento do índice de letalidade entre as pessoas com a COVID-19. A relação das alterações nos mecanismos de coagulação de pacientes com COVID-19 e o aumento dos índices de letalidade apontam para a ocorrência de eventos trombóticos como a coagulação intravascular disseminada (CIVD), trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar (EP).⁽⁵⁻⁸⁾

Portanto, compreender a relação entre os mecanismos hemostáticos e a infecção pela COVID-19 torna-se de fundamental importância para auxiliar os profissionais de saúde nas condutas laboratoriais, clínicas e terapêuticas no monitoramento dos casos e melhores encaminhamentos.

¹Doutora em Ciências Farmacêuticas (UFMG), docente na Universidade do Vale do Itajaí (Univali). Itajaí-SC, Brasil.

²Graduado em Biomedicina pela Universidade do Vale do Itajaí (Univali). Itajaí-SC, Brasil.

Instituição: Universidade do Vale do Itajaí (Univali). Itajaí-SC, Brasil.

Recebido em 01/08/2020

Artigo aprovado em 17/08/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200008

METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma revisão da literatura onde foram consultadas as bases de dados SciELO (*Scientific Eletronic Library Online*), PubMed (*National Library of Medicine*), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e Google Acadêmico por artigos com a temática envolvendo coagulação e a COVID-19. Para busca dos artigos foram utilizadas as seguintes terminologias: COVID-19; Coagulação (*Coagulation*); Trombose (*Thrombosis*); Dímero-D (*D-Dimer*); Anticoagulação (*Anticoagulation*). Os critérios aplicados para seleção dos artigos foram a disponibilidade nas bases de dados e a adequação de conteúdo à temática deste estudo. Foram excluídas as publicações que se repetiram em mais de uma base de dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coagulopatia na COVID-19 é um evento frequentemente descrito na literatura recente e está associada a um estado de hipercoagulabilidade; entretanto, os processos moleculares associados à sua causa ainda permanecem desconhecidos e necessitam de maior investigação.⁽⁶⁾ O mecanismo de coagulação é um processo que envolve a interação de três componentes-chave: células endoteliais, plaquetas e fatores de coagulação. Quadros infecciosos severos são capazes de provocar um superestímulo com consumo dos fatores de coagulação, desencadeando uma coagulação intravascular disseminada. A CIVD em pacientes com COVID-19 está ligada ao aumento das taxas de mortalidade pela doença, e evidências apontam que pacientes infectados pelo vírus apresentaram anormalidades clínicas e laboratoriais na coagulação.^(5,8,9)

Um quadro inflamatório agudo que pode evoluir para hipóxia e manifestações trombóticas tem sido descrito em alguns artigos. A trombose microvascular afeta principalmente pulmões, causando embolia pulmonar em até 30% dos casos, além de complicações renais e cardíacas, até falência múltipla dos órgãos nos casos mais severos.^(10,11)

Os mecanismos envolvidos na ocorrência de estados de hipercoagulabilidade e CIVD em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 permanecem sendo estudados, entretanto, algumas hipóteses já são discutidas. Uma delas é a entrada do vírus nas células através dos receptores de angiotensina 2 (ACE2), altamente expressos nas células pulmonares, além de miocárdio e outras células endoteliais. A lesão destas células aumenta a resposta inflamatória, com liberação de mais citocinas e fator de necrose tumoral e conseqüente estímulo pró-coagulante.⁽¹³⁾ Além disso, a ligação do vírus aos receptores ACE2 causa a ativação anormal do eixo renina-angiotensina levando

do à adesão e agregação plaquetária, aumentando o risco de tromboembolismo.⁽¹⁴⁾

A resposta imunológica inata aos processos infecciosos também pode estar ligada ao estado pró-coagulante da COVID-19. Devido ao compartilhamento de vias entre a resposta imunológica e a regulação da coagulação, a ação de determinados componentes das vias de resposta imunológica pode apresentar um papel pró-coagulante, como, por exemplo, fator tecidual.⁽¹⁵⁾ É fundamental destacar a ocorrência do estado "tempestade de citocinas" (*Cytokine storm*) no processo inflamatório e de coagulação da COVID-19. Neste cenário, a liberação de interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), entre outras moléculas de caráter inflamatório, aumentam a expressão de fator tecidual e fator de Von Willebrand em células endoteliais e macrófagos ativados nos tecidos atingidos, promovendo agregação plaquetária e desencadeando a cascata de coagulação. Além disso, as citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel crítico na supressão dos mecanismos fisiológicos de anticoagulação e fibrinólise, impedindo a regulação adequada da homeostasia na COVID-19.^(16,17) Além dos fatores anteriormente citados, a formação de NETs (*neutrophil extracellular traps*) e DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) pode estar envolvida na formação do papel pró-coagulante da COVID-19.⁽¹⁸⁾ A formação de NETs, estruturas formadas por DNA e proteínas em forma de rede secretadas por neutrófilos durante processos inflamatórios, está associada ao início de processos trombóticos em artérias e veias.⁽¹⁹⁾

A enzima conversora de angiotensina humana 2, que está expressa amplamente em células endoteliais, venosas, arteriais e células musculares lisas, foi identificada como receptor funcional para SARS-CoV-2, seguida de uma ativação anormal do sistema renina-angiotensina, inflamação do endotélio, podendo estar relacionada a alterações anormais da coagulação e sepse. A coagulopatia é um importante fator de risco para doença grave e morte em pacientes com COVID-19.⁽²⁰⁾

Varga et al.⁽²¹⁾ confirmam que a disfunção das células endoteliais interagindo com a inflamação na infecção viral indica um pior prognóstico em pacientes COVID-19 com coagulopatias.

Certamente a coagulação e a imunidade inata estão correlacionadas e interligadas porque compartilham vias comuns em resposta à invasão viral e lesão, como o fator tecidual, um importante desencadeador da coagulação com propriedades pró-coagulantes e pró-inflamatórias da resposta imune do hospedeiro.⁽¹⁵⁾

Imunotrombose é o termo citado por Thachil e Srivastava⁽²²⁾ quando, após a invasão do micro-organismo na circulação sanguínea, ocorre a lesão da parede vascular, e a trombina formada desempenha um papel cen-

tral na ligação das vias de coagulação ao sistema imunológico inato. A ligação entre os outros fatores de coagulação como, por exemplo, a caliceína-cinínogênio, que está associada à produção de citocinas e à ação do sistema complemento, reforçando a relação entre a coagulação e o sistema imune inato.

Segundo Panigada et al.,⁽²³⁾ o estado inflamatório grave secundário à COVID-19 leva a uma grave desordem da hemostasia, que foi recentemente descrita como um estado de CIVD, uma importante coagulopatia de consumo, definida como diminuição da contagem de plaquetas, aumento dos produtos de degradação da fibrina, como Dímero-D, bem como baixo fibrinogênio.

A Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH)⁽²⁴⁾ propõe orientações para o manejo das coagulopatias na COVID-19, fornecendo uma estratificação de risco na admissão para um paciente infectado com base em parâmetros laboratoriais disponíveis. Um dos achados laboratoriais mais comuns observados em pacientes com COVID-19 que necessitam de hospitalização tem sido o aumento de Dímero-D. Os mais idosos e com comorbidades tendem a ter um Dímero-D mais alto, sendo os mais propensos a morrer de infecção por COVID-19. Devido a um alto volume de pacientes nos hospitais, medidas de estratificação de risco seriam claramente úteis.

A COVID-19 pode apresentar um perfil hematológico com contagem diminuída de plaquetas. Estudos com pacientes diagnosticados com a doença demonstram que a trombocitopenia encontrada nos pacientes esteve associada a casos mais severos e pior prognóstico, bem como o aumento da probabilidade do desenvolvimento da forma grave da doença e maior letalidade.⁽²⁵⁻²⁷⁾

Embora os autores anteriores apontem no sentido de demonstrar a relação entre contagem de plaquetas e prognóstico da COVID-19, Wang et al.,⁽²⁸⁾ em um estudo com 138 pacientes, não encontraram variação significativa na contagem de plaquetas entre pacientes com COVID-19 que não necessitaram de admissão em UTI daqueles que foram admitidos em UTI. No mesmo sentido, Young et al.⁽²⁹⁾ descrevem contagens de plaquetas similares entre pacientes que necessitaram de internação e oxigênio suplementar e aqueles que não necessitaram de oxigênio suplementar, entretanto, o estudo não realizou análise estatística deste parâmetro.

A avaliação clínica da presença de tromboembolismo venoso (TEV), associação de trombose venosa profunda em conjunto com embolia pulmonar, foi realizada em pacientes com diagnóstico confirmado de COVID-19. Os resultados confirmaram a presença de TEV nos pacientes com a doença, onde o grupo positivo para TEV apresentou índice maior de óbitos em relação ao grupo que não desenvolveu TEV. Além do índice de letalidade aumentado, o grupo de pacientes positivos para TEV apre-

sentou resultados com tempo de tromboplastina ativada (APTT) elevados em relação ao grupo não TVP, diminuição da contagem de linfócitos e aumento sérico dos níveis de Dímero-D.⁽³⁰⁾ O mesmo perfil nos testes de coagulação foi encontrado por Tang et al.,⁽⁸⁾ cujo estudo, além de resultados elevados da dosagem de produtos de degradação de fibrina (PDF), encontrou forte correlação entre o aumento de Dímero-D plasmático e o pior prognóstico da doença, com o grupo de não sobreviventes apresentando a média das dosagens de Dímero-D acima da média do grupo de sobreviventes.

A avaliação dos níveis de Dímero-D aponta este como um marcador com forte valor preditivo positivo para um pior prognóstico da doença. Um estudo sugere que, utilizando-se o valor de 2,0 µg/mL como ponto de corte, o teste pode apresentar sensibilidade de 92,3% e especificidade de 83,3% para prever o índice de letalidade de pacientes com COVID-19.⁽³¹⁾

Em um estudo hemostático com 24 pacientes em terapia intensiva em decorrência da COVID-19, foram observados um estado de hipercoagulabilidade através da tromboelastografia (TEG), plaquetas com contagem normal ou elevada, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativa (TTPa) próximos ao normal, porém o fibrinogênio apresentou-se elevado e o Dímero-D muito elevado. Além disso, a proteína C ativada, o Fator VIII e Fator de Von Willebrand e marcadores pró-coagulantes apresentaram níveis elevados, enquanto que o marcador de anticoagulação natural antitrombina (ATIII) estava diminuído.⁽²³⁾ Estes achados podem explicar a ocorrência de TEV e o suporte anticoagulante como profilaxia antitrombótica no tratamento da COVID-19.

Hemostasia anormal também foi observada no perfil desses pacientes, com aumento do Dímero-D em mais de 70% deles, além de parâmetros com prolongamento mínimo como tempo de protrombina (TP) e leve redução na contagem de plaquetas ($>100.000/\text{mm}^3$), mas com aumento acentuado dos níveis de fibrinogênio e ausência de esquistócitos, sem presença de sangramentos.⁽²²⁾

A terapia anticoagulante com heparina de baixo peso molecular (HBPM) deve ser considerada em todos os casos de COVID-19, inclusive os não críticos, apesar das contraindicações devido a possíveis sangramentos associados à plaquetopenia. Têm sido descritas propriedades anti-inflamatórias da heparina, sendo benéfica nas infecções pelo SARS-CoV-2, onde as citocinas pró-inflamatórias estão significativamente elevadas, além de uma evolução com melhor prognóstico e diminuição da mortalidade como uso de HBPM.^(8,24)

Tang et al. utilizaram o sistema de score proposto pela ISTH, no qual a coleta dos dados dos exames laboratoriais, como tempo de protrombina, contagem de plaquetas, Dímero-D, além da observação clínica de falência dos

órgãos, foram utilizados para observar grupos com terapia anticoagulante durante sete dias ou mais e grupos com menos de sete dias de anticoagulação com heparina. Os resultados mostraram uma significativa redução da mortalidade no grupo com maior tempo de terapia anticoagulante.⁽⁸⁾

A trombotoprofilaxia padrão utiliza HBPM ou heparina não fracionada (HNF). Porém, na COVID-19, a prevalência de eventos trombóticos é extraordinariamente alta, necessitando de uma trombotoprofilaxia mais agressiva usando HBPM ou HNF de forma mais prolongada e doses individualizadas, principalmente em pacientes com múltiplos fatores de risco como obesidade, diabetes e câncer.⁽¹³⁾

Panigada et al. concluem que o estado de hipercoagulabilidade associado ao achado clínico de embolia pulmonar e trombose venosa profunda, observados em alguns pacientes com COVID-19, necessitam profilaxia antitrombótica com HBPM ou HNF. A escalada das doses da profilaxia até o tratamento necessita considerar a relação risco/benefício até que os ensaios clínicos informem aos médicos para a tomada de decisão.⁽²³⁾

Estudos propõem a HBPM como a melhor alternativa para pacientes graves com COVID-19 que apresentam o Dímero-D elevado. Nas coagulopatias induzidas por sepse, foi observado um melhor prognóstico e menor mortalidade nestes casos.^(8,11,24)

CONCLUSÃO

Conclui-se que, embora os mecanismos específicos ainda não estejam claros, a infecção pelo SARS-CoV-2 obviamente envolve processos potencialmente deletérios na coagulação e inflamação.⁽²⁰⁾ Pacientes com COVID-19 apresentam um quadro de hipercoagulabilidade, associada à infecção severa, evoluindo para EP e/ou TVP, e alguns casos mais graves de CIVD. Os exames que avaliaram a hemostasia e se apresentaram elevados foram principalmente Dímero-D, TP e fibrinogênio, e alguns casos mais graves tiveram a contagem de plaquetas diminuída como consequência da CIVD. A terapia anticoagulante com HBPM foi a melhor alternativa terapêutica em todos os grupos e em fases iniciais como profilaxia, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, e, nas fases mais críticas, determinando um melhor prognóstico e menor letalidade.

É fundamental ressaltar que o Dímero-D foi o resultado que apresentou melhor concordância com o prognóstico dos pacientes infectados, revelando-se como um marcador de valor preditivo positivo para prescrição de profilaxia com altas dosagens de heparina. Há, portanto, uma quebra de paradigma, pois o Dímero-D é utilizado como marcador de valor preditivo negativo na exclusão de eventos trombóticos.

Abstract

COVID-19 pandemic is an emergency in current society, affecting the countries and their populations at different levels, as well as a threat to health systems around the world. Understanding the relationship between the pathophysiological mechanisms in SARS-CoV-2 infection and the coagulation system has become an important tool for researchers and healthcare workers worldwide so that effective strategies can be designed and followed for the recovery of patients affected by the disease. This article is characterized as a review on homeostasis in COVID-19 through research and analysis in electronic databases. It was observed that the occurrence of thrombotic events and changes in coagulation parameters in patients with COVID-19 has been described in several studies, and the use of anticoagulant drugs is already an alternative to reduce the lethality of the virus in certain cases. Also, D-Dimer appears as a marker of disease prognosis, suggesting the link between the hypercoagulable state of the disease, resulting from acute inflammation, and its lethality rate.

Keywords

COVID-19; disseminated intravascular coagulation; anticoagulant, D-Dimer

REFERÊNCIAS

- Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020 Apr;92(4):418-23. doi: 10.1002/jmv.25681.
- OMS. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it [Internet]. 2020. [Acesso em 2020 Jul 16]. Disponível em: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
- Guan W-J, Ni Z-Y, Hu Y, Liang W-H, Ou C-Q, He J-X, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020/02/28 ed. 2020 Apr;382(18):1708-20. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
- Ministério da Saúde (Brasil). Portaria MS/GM no 188, de 3 de fevereiro de 2020. Declara Emergência em Saúde Pública de importância Nacional (ESPIN) em decorrência da Infecção Humana pelo novo Coronavírus (2019-nCoV) [Internet]. Diário Oficial da União. 13 fev 2020; seção 1.
- Danzi GB, Loffi M, Galeazzi G, Gherbesi E. Acute pulmonary embolism and COVID-19 pneumonia: a random association? *Eur Heart J.* 2020 May;41(19):1858-1858. doi:10.1093/eurheartj/ehaa254.
- Iba T, Levy JH, Levi M, Connors JM, Thachil J. Coagulopathy of Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Med.* 2020 May. doi: 10.1097/CCM.0000000000004458.
- Lillicrap D. Disseminated intravascular coagulation in patients with 2019-nCoV pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2020 Apr;18(4):786-7. doi: 10.1111/jth.14768.
- Tang N, Bai H, Chen X, Gong J, Li D, Sun Z. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost.* 2020;18(5):1094-9. doi: 10.1111/jth.1481.
- Han H, Yang L, Liu R, Liu F, Wu K-L, Li J, et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clin Chem Lab Med.* 2020 25;58(7):1116-20. doi: 10.1515/cclm-2020-0188.
- Helms J, Tacquard C, Severac F, Leonard-Lorant I, Ohana M, Delabranche X, et al. High risk of thrombosis in patients with severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med.* 2020 Jun;46(6):1089-98. doi: 10.1007/s00134-020-06062-x.
- Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, Chuich T, Dreyfus I, Driggin E, et al. COVID-19 and thrombotic or thromboembolic disease: implications for prevention, antithrombotic therapy, and follow-up: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2020 Jun; 75(23):2950-73. doi: 10.1016/j.jacc.2020.04.031.

12. Lin L, Lu L, Cao W, Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Dec;9(1):727-32. doi: 10.1080/22221751.2020.1746199.
13. Joly BS, Siguret V, Veyradier A. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. *IntensiveCareMed* [Internet]. 2020 May [Acesso em 2020 Jul 19]; Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00134-020-06088-1>.
14. Yang T, Chen Y-Y, Liu J-R, Zhao H, Vaziri ND, Guo Y, et al. Natural products against renin-angiotensin system for antifibrosis therapy. *Eur J Med Chem.* 2019 Oct;179:623-33. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.06.091.
15. Delvaeye M, Conway EM. Coagulation and innate immune responses: can we view them separately? *Blood.* 2009 Sep; 114(12):2367-74. doi: 10.1182/blood-2009-05-199208.
16. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet Lond Engl.* 2020/01/24 ed. 2020 Feb;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
17. Lipinski S, Bremer L, Lammers T, Thieme F, Schreiber S, Rosenstiel P. Coagulation and inflammation. Molecular insights and diagnostic implications. *Hamostaseologie.* 2011 May;31(2):94-102, 104. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
18. Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM, et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* [Internet]. 2020 Apr [Acesso em 2020 Jul 16];217(e20200652). Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20200652>.
19. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Aug;32(8):1777-83. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.242859.
20. Wang J, Saguner AM, An J, Ning Y, Yan Y, Li G. Dysfunctional Coagulation in COVID-19: From Cell to Bedside. *Adv Ther.* 2020 Jul;37(7):3033-9. doi: 10.1007/s12325-020-01399.
21. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet Lond Engl.* ed. 2020 May;395(10234):1417-8. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
22. Thachil J, Srivastava A. SARS-2 Coronavirus-Associated Hemostatic Lung Abnormality in COVID-19: Is It Pulmonary Thrombosis or Pulmonary Embolism? *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2020 May [Acesso em 2020 Jul 22]; Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0040-1712155>.
23. Panigada M, Bottino N, Tagliabue P, Grasselli G, Novembrino C, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: A report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. *J Thromb Haemost JTH.* 2020; 18(7):1738-42. doi: 10.1111/jth.14850.
24. Thachil J, Tang N, Gando S, Falanga A, Cattaneo M, Levi M, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2020;18(5):1023-6. doi: 10.1111/jth.14810.
25. Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2020 Jul;506:145-8. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.022.
26. Yang X, Yang Q, Wang Y, Wu Y, Xu J, Yu Y, et al. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2020;18(6):1469-72. doi: 10.1111/jth.14848.
27. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020 Mar;323(11):1061-9. doi: 10.1001/jama.2020.1585.
28. Young BE, Ong SWX, Kalimuddin S, Low JG, Tan SY, Loh J, et al. Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore. *JAMA.* 2020 Apr;323(15):1488-94. doi: 10.1001/jama.2020.3204.
29. Cui S, Chen S, Li X, Liu S, Wang F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost JTH.* 2020/05/06 ed. 2020 Jun;18(6):1421-4. doi: 10.1111/jth.14830.
30. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost JTH.* 2020/03/13 ed. 2020 Apr; 18(4):844-7. doi: 10.1111/jth.14768.
31. Zhang L, Yan X, Fan Q, Liu H, Liu X, Liu Z, et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost JTH.* 2020 Jun;18(6):1324-9. doi: 10.1111/jth.14859.

Correspondência

Anna Paula de Borba Batschauer
Laboratório Batschauer Ltda
Rua Manoel Vieira Garçon, 53
Itajaí-SC, Brasil
qualidade@b.com.bratschauer

A relação entre o sistema sanguíneo ABO e a COVID-19: uma revisão sistemática

The relationship between the ABO blood system and COVID-19: a systematic review

Alexandre Geraldo¹

Flávia Martinello²

Resumo

A atribuição do sistema sanguíneo ABO às infecções não é recente e não é exclusiva de infecções virais. A relação entre a COVID-19 e o grupo sanguíneo ABO de pacientes infectados tem sido investigada. O objetivo desta revisão foi avaliar se a associação do sistema sanguíneo ABO com SARS-CoV-2 envolve a isomeria ABO tecidual e subgrupos sanguíneos. Realizou-se uma revisão sistemática com busca de artigos e publicações até 28 de julho de 2020 na base PubMed. Foram obtidos 311 manuscritos dos quais 15 atenderam os critérios de inclusão e foram incluídos no estudo. Quarenta por cento dos estudos discutiram a possibilidade dos antígenos teciduais ABO influenciar na transmissão ou gravidade da COVID-19. Nenhum manuscrito mencionou que a isomeria antigênica ABO tecidual poderia predispor indivíduos às infecções por SARS-CoV-2 ou agravamento da COVID-19. Um manuscrito discutiu a possibilidade de o impedimento estérico afetar a saturação do receptor de diferentes isótipos de anticorpos anti-A, IgG em pacientes que desenvolveram COVID-19. Se rejeitássemos cartas e/ou comentários, análises profundas sobre o aspecto do sistema sanguíneo ABO e infecções por SARS-CoV-2 teriam sido excluídos e prejudicariam a discussão científica e as conclusões da revisão.

Palavras-chave

Sistema ABO de Grupos Sanguíneos; COVID-19; SARS-CoV-2; infecções por Coronavírus

INTRODUÇÃO

Desde o primeiro surto em Wuhan, na China, em dezembro de 2019, a nova doença por coronavírus (COVID-19) se espalhou rapidamente tendo como consequência a declaração de pandemia no dia 11 de março de 2020 pela Organização Mundial de Saúde.⁽¹⁾

Os fundamentos moleculares da síndrome respiratória aguda grave pela infecção por coronavírus 2 (SARS-CoV-2) e da doença que causa, doença por coronavírus 2019 (COVID-19), são pouco compreendidos. A genética é uma ferramenta importante para elucidar as causas e consequências e pode gerar *insights* que orientem intervenções terapêuticas para prevenir ou tratar doenças. Até o momento, pouco se sabe sobre a suscetibilidade genética à infecção por SARS-CoV-2 e às formas graves de COVID-19.⁽²⁾

Inúmeras pesquisas que investigam vacinas, testes moleculares e sorológicos, bem como estudos clínicos para a compreensão da fisiopatologia da COVID-19 vêm sendo publicados. A investigação da fisiopatologia tem explora-

do a relação entre o grupo sanguíneo ABO de pacientes infectados e que desenvolveram a COVID-19. Contudo, a atribuição do sistema sanguíneo ABO às infecções não é recente e não é exclusiva de infecções virais.^(3,4)

O grupo sanguíneo ABO é exemplo de adaptação evolutiva onde, por milhares de anos, microrganismos e humanos interagiram de forma simbiótica ou patológica, influenciando na genética das populações e na evolução do genoma humano pela seleção natural de alelos específicos capazes de modificar a patogênese.⁽⁵⁾

Os antígenos do sistema ABO são carboidratos presentes na superfície das células sanguíneas, tecidos e nas secreções, os quais são adicionados por glicosiltransferases específicas, codificadas através de informações contidas no locus ABO.⁽⁶⁾ A heterogeneidade fenotípica dos antígenos do Sistema ABO é demonstrada pelos diferentes genes que expressam as glicosiltransferases. O gene A codifica a enzima N-acetil-galactosamina transferase, que adiciona uma N-D-acetilgalactosamina ao antígeno H, formando o fenótipo A; já o gene B codifica a enzima galactosiltransferase, que adiciona uma D-galactose ao

¹Docente da Universidade do Vale do Itajaí (Univali). Itajaí-SC, Brasil.

²Docente do Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis-SC, Brasil.

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis-SC, Brasil.

Recebido em 03/08/2020

Artigo aprovado em 17/08/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200016

antígeno H gerando o fenótipo B. Quando há atividade das duas enzimas simultaneamente ocorre a formação do fenótipo AB, e quando não há atividade de ambas as glicosiltransferases temos o fenótipo O, composto apenas pelo antígeno H.⁽⁷⁾

A ação das glicosiltransferases pode ser diferente devido a produtos de genes alelos variantes ou mutantes do locus ABO. Estes antígenos são definidos como subgrupos ABO, os quais apresentam como característica uma significativa redução no número de sítios antigênicos expressos nas hemácias e nos tecidos. Isto ocorre porque as mutações genéticas desencadeiam uma alteração na especificidade das glicosiltransferases resultando em uma menor capacidade catalítica da enzima.^(7,8)

Cotidianamente, o sistema sanguíneo ABO está associado aos eritrócitos. Contudo, a isomeria dos antígenos eritrocitários pode ser diferente em relação aos tecidos. Por exemplo, Schenkel-Brunner observou antígenos enantiômeros humanos do Grupo A presentes na mucosa gástrica.⁽⁹⁾ Autores sugerem que não basta realizar a associação do sistema sanguíneo ABO com patógenos, mas também avaliar as estruturas precursoras dos antígenos ABO contidas nos tecidos, visto que a densidade antigênica tecidual pode variar entre pessoas do mesmo grupo sanguíneo. Atualmente são descritos seis tipos de substâncias precursoras para formação dos antígenos ABO:

Tipo 1: Gal β 1- \rightarrow 3GlcNAc β 1- \rightarrow R;

Tipo 2: Gal β 1- \rightarrow 4GlcNAc β 1- \rightarrow R;

Tipo 3: Gal β 1- \rightarrow 3GalNAc α 1- \rightarrow R;

Tipo 4: Gal β 1- \rightarrow 3GalNAc β 1- \rightarrow R;

Tipo 5: Gal β 1- \rightarrow 3Gal β 1- \rightarrow R e

Tipo 6: Gal β 1- \rightarrow 4Glc β 1- \rightarrow R.⁽⁹⁻¹¹⁾

Embora haja essa diversidade de substâncias precursoras, o radical (R) será fundamental na determinação do antígeno final: no caso do sistema ABO, a presença da L-Fucose (Grupo O), associada ou não à D-galactose (Grupo B) ou à N-D-acetilgalactosamina (Grupo A).⁽⁹⁻¹¹⁾

Nesse contexto, o objetivo desta revisão sistemática foi avaliar se a relação do sistema sanguíneo ABO com o SARS-CoV-2 envolve a isomeria ABO tecidual e subgrupos sanguíneos.

MATERIAL E MÉTODOS

Pesquisa na literatura

A pesquisa bibliográfica foi realizada no banco de dados do *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (PubMed). Foram pesquisados artigos científicos publicados entre janeiro e 28 de julho de 2020.

Primeira etapa

A busca foi realizada com a combinação de palavras-chave *sistema sanguíneo ABO*, *sistemas sanguíneos e*

COVID-19, utilizando-se duas combinações codificadas conforme descrição:

T1 = Coronavirus OR 2019-nCoV OR 2019nCoV OR COVID-19 OR SARS-CoV-2 AND Blood Group.

T2 = Coronavirus OR 2019-nCoV OR 2019nCoV OR COVID-19 OR SARS-CoV-2 AND Blood Group ABO.

Os títulos e resumos dos artigos encontrados na plataforma foram analisados e selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

Para ambas as combinações de palavras-chave (T1 e T2) foram utilizados os seguintes critérios de inclusão dos manuscritos:

- artigos publicados no período estipulado;
- estudos de caráter clínico, revisões bibliográficas, comunicações, cartas ao editor e relatos de caso;
- estudos que apresentassem em seu resumo qualquer informação relacionando os grupos sanguíneos com a SARS-CoV-2.

Foram considerados como critérios de exclusão:

- estudos que realizaram análise de outros grupos sanguíneos apenas, não ABO;
- artigos sem informação clínica ou laboratorial do grupo sanguíneo ABO relacionados ao SARS-CoV-2.

Segunda etapa

Após a primeira etapa para ambas as combinações de palavras-chave foi realizada a codificação das publicações e a leitura completa dos artigos. Os critérios de exclusão da segunda etapa foram:

- estudos que realizaram análise de outros grupos sanguíneos apenas, não ABO;
- artigos sem informação clínica ou laboratorial do grupo sanguíneo ABO relacionados ao SARS-CoV-2.

Análise de dados

Os dados coletados foram agrupados e organizados no programa Excel®, descritos e organizados em forma de quadros. Os resultados foram expressos em percentuais e números absolutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A combinação de palavras-chave T1 na plataforma PubMed buscou 311 manuscritos. Destes, 36 (11,6%) passaram para a segunda etapa, a qual excluiu 21 (86,1%) manuscritos. A combinação de palavras-chave T2 encontrou 16 manuscritos, sendo todos também encontrados com a combinação T1. Os 15 manuscritos incluídos na revisão estão apresentados no Quadro 1.

Nenhum dos manuscritos apresentados no Quadro 2 mencionou que a isomeria antigênica ABO tecidual poderia predispor indivíduos a infecções por SARS-CoV-2 ou agravamento da COVID-19. Embora haja estudos que

Quadro 1 - Manuscritos apresentados pelo PubMed após pesquisa com as palavras-chave T1 e T2, e incluídos no estudo

Código	Título	Tipo de Manuscrito	Mês de publicação
001 ⁽¹²⁾	ABO blood group predisposes to COVID-19 severity and cardiovascular diseases	Comentário	Abril
002 ⁽¹³⁾	Testing the association between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death	Artigo original	Abril
003 ⁽¹⁴⁾	COVID-19 and ABO blood group: another viewpoint	Correspondência	Mai
004 ⁽¹⁵⁾	Harnessing the natural anti-glycan immune response to limit the transmission of enveloped viruses such as SARS-CoV-2	Opinião	Mai
005 ⁽¹⁶⁾	The effects of blood group types on the risk of COVID-19 infection and its clinical outcome	Artigo original	Junho
006 ⁽¹⁷⁾	COVID-19 and the ABO blood group connection	Carta ao Editor	Junho
007 ⁽¹⁸⁾	Relationship between ABO blood group distribution and clinical characteristics in patients with COVID-19	Artigo original	Junho
008 ⁽¹⁹⁾	Genome wide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure	Artigo original	Junho
009 ⁽²⁰⁾	Anti-A iso haemagglutinin titres and SARS-CoV-2 neutralization: implications for children and convalescent plasma selection	Correspondência	Junho
010 ⁽²¹⁾	Improved Clinical Symptoms and Mortality on Severe/Critical COVID-19 Patients Utilizing Convalescent Plasma Transfusion	Artigo original	Junho
011 ⁽²²⁾	Association between ABO blood groups and risk of SARS-CoV-2 pneumonia	Correspondência	Julho
012 ⁽²³⁾	ABO Phenotype and Death in Critically Ill Patients with COVID-19	Correspondência	Julho
013 ⁽²⁴⁾	More on 'Association between ABO blood groups and risk of SARS-CoV-2 pneumonia'	Correspondência	Julho
014 ⁽²⁵⁾	Lower prevalence of antibodies neutralizing SARS-CoV-2 in group O French blood donors	Comunicação breve	Julho
015 ⁽²⁶⁾	ABO blood groups are not associated with risk of acquiring the SARS-CoV-2 infection in young adults	Artigo original	Julho

Quadro 2 - Resumo das informações de interesse observadas nos manuscritos incluídos no estudo

Código	O manuscrito relaciona isomeria ABO tecidual e COVID-19?		O manuscrito discute a possibilidade dos antígenos ABO teciduais influenciar no prognóstico da COVID-19?		O manuscrito relaciona subgrupos sanguíneos ABO e COVID-19?	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
001 ⁽¹²⁾		X		X		X
002 ⁽¹³⁾		X		X		X
003 ⁽¹⁴⁾		X		X		X
004 ⁽¹⁵⁾		X		X		X
005 ⁽¹⁶⁾		X		X		X
006 ⁽¹⁷⁾		X	X			X
007 ⁽¹⁸⁾		X		X		X
008 ⁽¹⁹⁾		X		X		X
009 ⁽²⁰⁾		X		X	X*	
010 ⁽²¹⁾		X		X		X
011 ⁽²²⁾		X	X			X
012 ⁽²³⁾		X	X			X
013 ⁽²⁴⁾		X	X			X
014 ⁽²⁵⁾		X	X			X
015 ⁽²⁶⁾		X	X			X

*Discute o impedimento estérico de anticorpos, mas não isomeria de antígenos ABO

apontem a ligação de patógenos aos antígenos ABO.⁽²⁷⁻³¹⁾ Springer e colaboradores relatam que a ligação entre bactérias e antígenos ABO ocorre somente com um dos enantiômeros do monossacarídeo ABO.⁽³⁾ A isomeria dos antígenos ABO parece influenciar nas reações antígeno-anticorpo. A ausência da análise sob a ótica da relação de antígenos histológicos ABO e a adesão do SARS-CoV-2 a estes pode estar relacionada à complexidade dessa análise. As estruturas de carboidratos são extremamente complexas devido à existência de inúmeras formas isoméricas que resultam de vários isômeros posicionais, tipos de ligação (α ou β) e configurações de vários blocos de formação de monossacarídeos. Essa complexidade resulta nas limitações das ferramentas analíticas disponíveis para esses estudos, como a espectrometria de massa, espectrometria de mobilidade iônica, fotodissociação ultravioleta a vácuo, cromatografia líquida de interação hidrofílica e a espectrometria de mobilidade iônica-massa.⁽³²⁾

Embora não tenha sido mencionada a isomeria ABO tecidual, 40% dos estudos discutiram a possibilidade de os antígenos histológicos ABO influenciar na transmissão ou gravidade da COVID-19. Dentre os seis manuscritos, apenas um era artigo original, os demais eram correspondências ou comunicação breve.

O epitélio que reveste o trato gastrointestinal, respiratório, urinário e reprodutivo expressa uma grande quantidade de glicolipídios e glicoproteínas que resulta na formação dos antígenos ABH e Lewis.⁽⁹⁾ Destaca-se que o manuscrito 012 sugere a influência do *status* de secretor ABO e antígenos de Lewis na criticidade dos pacientes com Covid-19.⁽²³⁾

Apenas um manuscrito (correspondência 009) discutiu a possibilidade de o impedimento estérico afetar a saturação do receptor de diferentes isotipos de anticorpos anti-A₁IgG em pacientes que desenvolveram COVID-19.⁽²⁰⁾ Essa hipótese veio à tona na discussão sobre o tratamento com plasma convalescente em pacientes com COVID-19.^(33,34) A discussão do manuscrito 009⁽²⁰⁾ corroborou a hipótese de outros autores quanto ao uso do anticorpo natural anti-Gal α 1-3Gal presente em plasma de doadores de sangue, o qual poderia neutralizar o SARS-CoV-2 por meio da ligação no escudo glicano.^(35,36) Porém, a discussão aborda o impedimento estérico de anticorpos e não a isomeria de hidratos de carbono ABO teciduais. Desta forma, esse manuscrito não foi contabilizado nesse quesito. Contudo, o mesmo manuscrito discutiu a relação de subgrupos sanguíneos ABO com SARS-CoV-2, sem detalhá-la. Nesse contexto, outros estudos demonstraram menor expressão dos antígenos de subgrupo ABO em plaquetas e no fígado.^(37,38)

Não há estudos que apontem que subgrupos sanguíneos ABO poderiam ser menos susceptíveis à infecção por SARS-CoV-2. As discussões sobre o assunto são

decorrentes do manuscrito 011⁽²²⁾ e o de Zhao e colaboradores.⁽³⁹⁾ Este último não consta em nossos resultados visto que o periódico não está indexado no PubMed e foi publicado sem revisão por pares. Esses autores avaliaram a associação dos grupos sanguíneos ABO e o risco de pneumonia por SARS-CoV-2 em pacientes hospitalizados na China. Eles observaram que o grupo sanguíneo A foi associado a um risco maior de adquirir COVID-19 em comparação com não-A, enquanto que o grupo sanguíneo O foi associado a um menor risco para a infecção em comparação com grupos sanguíneos não-A.⁽³⁹⁾ O manuscrito 011, ao utilizar os dados publicados por Zhao e colaboradores e realizar novas análises estatísticas, demonstraram que os pacientes do grupo sanguíneo A estavam em maior risco de hospitalização após a infecção por SARS-CoV-2, enquanto que os pacientes do grupo sanguíneo O tinham menor risco.⁽²²⁾

Ainda que a maior repercussão científica tenha ocorrido em torno da correspondência 011,⁽²²⁾ o artigo original 008 avaliou em dois meses 1.980 pacientes com COVID-19 grave em sete hospitais de quatro cidades, bem como 2.381 participantes controles da Itália e Espanha durante o ápice concomitantemente de casos de SARS-CoV-2. Além da análise genética do HLA e do Cromossomo 3p21.31, os autores analisaram o locus ABO e evidenciaram um risco maior no grupo sanguíneo A do que em outros grupos sanguíneos e efeito protetor no grupo sanguíneo O em comparação com outros grupos sanguíneos.⁽¹⁹⁾

O manuscrito 012 apresentou resultados de pacientes dos Estados Unidos da América do grupo sanguíneo O com COVID-19 com quadros clínicos menos graves e menor tempo de hospitalização quando comparados com pacientes do Grupo A com a doença.⁽²³⁾ O manuscrito 013 discute os achados do manuscrito 011 e observou o menor risco de trombose no grupo sanguíneo O em comparação com indivíduos não-O. Além disso, os autores fazem importantes considerações sobre possíveis mecanismos biológicos pelos quais o sistema ABO modula o risco trombótico, principalmente em pacientes com COVID-19.⁽²⁴⁾ As discussões desses manuscritos também são fundamentadas em outros estudos que identificaram associações entre grupos sanguíneos ABO e SARS,⁽²⁷⁾ *Plasmodium falciparum*,⁽²⁸⁾ *Helicobacter pylori*,⁽²⁹⁾ vírus Norwalk⁽³⁰⁾ e *Neisseria gonorrhoeae*.⁽³¹⁾ ou com a gravidade das doenças causadas por esses patógenos.

Apenas o manuscrito 015 contestou as associações entre o grupo sanguíneo ABO e COVID-19. O estudo observacional de uma grande população de militares, que estavam confinados em um porta-aviões francês e que foram infectados ao mesmo tempo, não encontrou associação entre o grupo sanguíneo e a COVID-19. Os autores acreditam que essa associação possui ressalvas, uma vez que pacientes hospitalizados com COVID-19 foram infectados

em tempos e em situações epidemiológicas diferentes, comprometendo assim a análise de dados.⁽²⁶⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um fato importante observado em nosso estudo foi que os manuscritos não categorizados como artigos originais apresentaram uma análise mais profunda dos aspectos imunohematológicos do sistema sanguíneo ABO. Dentre os sete manuscritos que responderam aos nossos objetivos, quatro foram classificados como correspondências, uma comunicação breve e apenas um artigo original. Murugesan e colaboradores realizaram um estudo classificando os manuscritos pesquisados e excluíram relatos de caso, resumos, cartas e comentários.⁽⁴⁰⁾ Segundo Greenhalgh, os níveis de evidência científica são hierarquizados e classificados de acordo com o grau de confiança dos estudos, que está relacionado à qualidade metodológica dos mesmos, sendo que relato de caso é o que possui menor poder em revisões sistemáticas.⁽⁴¹⁾ Diferentemente desses autores, acreditamos que ao excluir cartas e/ou comentários dessa revisão sistemática, análises profundas sobre o aspecto do sistema sanguíneo ABO e infecções por SARS-CoV-2 teriam sido excluídos e prejudicariam a discussão científica e as conclusões da revisão.

Devido à pandemia da COVID-19 e à emergência do novo vírus, a Organização Mundial da Saúde considera que reflexões submetidas aos editoriais dos periódicos científicos não devem ser excluídos de revisões sistemáticas, uma vez que possíveis questionamentos, hipóteses, dados ou teorias podem proporcionar soluções para doenças infecciosas graves, como a SARS-CoV-19.⁽¹⁾

Observamos nesta revisão que há poucos manuscritos que relacionam o sistema sanguíneo ABO com a infecção por SARS-CoV-2 ou com a gravidade da COVID-19 e que são necessários mais estudos originais com observações à isomeria antigênica e de anticorpos anti-ABO.

Entre as limitações da nossa revisão, não pesquisamos se as comunicações, comentários, cartas, etc. foram submetidos à revisão por pares. Além disso, a busca de estudos foi realizada em apenas um banco de dados e mais pesquisas para elucidar a relação entre o sistema sanguíneo ABO e a COVID-19 devem ainda ser publicados.

Abstract

The assignment of the ABO blood system to infection is not new and is not exclusive to viral infections. The relationship between COVID-19 and the ABO blood group of infected patients has been investigated. The purpose of this review was to assess whether the association between ABO blood system and SARS-CoV-2 involves tissue ABO isomerism and blood subgroups. A systematic review was carried out with search until July 28, 2020 in PubMed database. Three hundred and eleven manuscripts were obtained, of which 15 met the inclusion criteria and were included in the study. Forty percent of the studies discussed the possibility of ABO tissue antigens influence the

transmission or severity of COVID-19. No manuscript mentioned that ABO tissue antigenic isomerism could predispose individuals to SARS-CoV-2 infections or severe COVID-19. A manuscript discussed the possibility of steric impediment affect receptorsaturation of the different antibodies A,IgG isotypes in COVID-19 patients. If the letters, correspondences or comments were rejected, deep analyzes of ABO blood system and SARS-CoV-2 infections relationship would have been excluded, and would undermine the scientific discussion and conclusions of the review.

Keywords

ABO Blood-Group System; COVID-19; SARS-CoV-2; Coronavirus infections

REFERÊNCIAS

1. Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Disponível em <<https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-11-march-2020>>
2. Plenge RM. Molecular Underpinnings of Severe Coronavirus Disease 2019 [published online ahead of print, 2020 Jul 24]. *JAMA*. 2020;10.1001/jama.2020.14015. doi:10.1001/jama.2020.14015
3. Springer GF, Williamson P, Brandes WC. Blood Group Activity of Gram-Negative Bacteria. *J Exp Med*. 1961;113(6):1077-1093. doi:10.1084/jem.113.6.1077.
4. Springer GF, Horton RE. Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group-active bacteria. *J Clin Invest*. 1969 Jul; 48(7):1280-1291. DOI:10.1172/JCI1106094.
5. Franchini M, Bonfanti C. Evolutionary aspects of ABO bloodgroup in humans. *Clin Chim Acta*. 2015;444:66-71. doi:10.1016/j.cca.2015.02.016.
6. Grimm LL, Weissbach S, Flügge F, Begemann N, Palcic MM, Peters T. Protein NMR Studies of Substrate Binding to Human Blood Group A and B Glycosyltransferases. *Chembiochem*. 2017;18(13):1260-1269. doi:10.1002/cbic.201700025.
7. Lee HS, Choi KM, Won EJ, Thi Phan M-T, Lee SY, Shin D-J, et al. Protein stability changes of the novel p.Arg180Cys mutant Aglycosyltransferase resulted in a weak A phenotype. *Vox Sang*. 2016;111(4):441-444. doi:10.1111/vox.12440.
8. Chun S, Phan MT, Kim HY, Shin D-J, Seo J-Y, Kim K-H, et al. The A312 Allele (c.280A>T) Is Responsible for the Weak A Phenotype. *Ann Clin Lab Sci*. 2017;47(1):99-102.
9. Schenkel-Brunner H. Human Blood Groups. Chemical and Biochemical Basis of Antigen Specificity. Springer Wien New York. Second Edition, 2000.
10. Uchida H, Kinoshita H, Kawai Y, Kitazawa H, Miura K, Shiiba K, et al. Lactobacilli Binding Human A-Antigen Expressed in Intestinal Mucosa. *Res Microbiol*. 2006;157(7):659-665. doi:10.1016/j.resmic.2006.03.001
11. Kochhar PK. Blood Transfusion in Clinical Practice. Editora Intech, 2012.
12. Dai X. ABO blood group predisposes to COVID-19 severity and cardiovascular diseases [published online ahead of print, 2020 Apr 28]. *Eur J Prev Cardiol*. 2020;2047487320922370. doi:10.1177/2047487320922370.
13. Zietz M, Tatonetti NP. Testing the association between blood type and COVID-19 infection, intubation, and death. Preprint. Medrxiv. 2020;2020.04.08.20058073. Published 2020 Apr 11. doi:10.1101/2020.04.08.20058073.
14. Gérard C, Maggipinto G, Minon JM. COVID-19 and ABO blood group: another viewpoint. *Br J Haematol*. 2020;190(2):e93-e94. doi:10.1111/bjh.16884.
15. Breiman A, Ruvën-Clouet N, Le Pendu J. Harnessing the natural anti-glycan immune response to limit the transmission of enveloped viruses such as SARS-CoV-2. *PLoS Pathog*. 2020;16(5):e1008556. Published 2020 May 21. doi:10.1371/journal.ppat.1008556.

16. Göker H, Aladag-Karakulak E, Demiroglu H, Ayaz CM, Büyükkasik Y, Inkaya AC, et al. The effects of blood group types on the risk of COVID-19 infection and its clinical outcome [published online ahead of print, 2020 Jun 4]. *Turk J Med Sci.* 2020;50(4):679-683. doi: 10.3906/sag-2005-395.
17. Zaidi FZ, Zaidi ARZ, Abdullah SM, Zaidi SZA. COVID-19 and the ABO blood group connection [published online ahead of print, 2020 Jun 3]. *Transfus Apher Sci.* 2020;102838. doi:10.1016/j.transci.2020.102838.
18. Wu Y, Feng Z, Li P, Yu Q. Relationship between ABO blood group distribution and clinical characteristics in patients with COVID-19 [published online ahead of print, 2020 Jun 17]. *Clin Chim Acta.* 2020;509:220-223. doi:10.1016/j.cca.2020.06.026.
19. Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillos A, Invernizzi P, et al. Genome wide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure [published online ahead of print, 2020 Jun 17]. *N Engl J Med.* 2020;10.1056/NEJMoa2020283. doi:10.1056/NEJMoa2020283.
20. Focosi D. Anti-Aiso haemagglutinin titres and SARS-CoV-2 neutralization: implications for children and convalescent plasma selection [published online ahead of print, 2020 Jun 9]. *Br J Haematol.* 2020;10.1111/bjh.16932. doi:10.1111/bjh.16932.
21. Xia X, Li K, Wu L, Wang Z, Zhu M, Huang B, et al. Improved clinical symptoms and mortality among patients with severe or critical COVID-19 after convalescent plasma transfusion [published online ahead of print, 2020 Jun 23]. *Blood.* 2020 Aug 6;136(6):755-759. doi: 10.1182/blood.2020007079.
22. Li J, Wang X, Chen J, Cai Y, Deng A, Yang M. Association between ABO blood groups and risk of SARS-CoV-2 pneumonia. *Br J Haematol.* 2020;190(1):24-27. doi:10.1111/bjh.16797.
23. Leaf RK, Al-Samkari H, Brenner SK, Gupta S, Leaf DE. ABO Phenotype and Death in Critically Ill Patients with COVID-19 [published online ahead of print, 2020 Jul 1]. *Br J Haematol.* 2020; 10.1111/bjh.16984. doi:10.1111/bjh.16984.
24. O'Sullivan JM, Ward S, Fogarty H, O'Donnell JS. More on 'Association between ABO blood groups and risk of SARS-CoV-2 pneumonia'. *Br J Haematol.* 2020;190(1):27-28. doi:10.1111/bjh.16845.
25. Gallian P, Pastorino B, Morel P, Chiaroni J, Ninove L, de Lamballerie X. Lower prevalence of antibodies neutralizing SARS-CoV-2 in group O French blood donors [published online ahead of print, 2020 Jul 14]. *Antiviral Res.* 2020;181:104880. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104880.
26. Boudin L, Janvier F, Bylicki O, Dutasta F. ABO blood groups are not associated with risk of acquiring the SARS-CoV-2 infection in young adults [published online ahead of print, 2020 Jul 23]. *Haematologica.* 2020;haematol.2020.265066. doi:10.3324/haematol.2020.265066.
27. Cheng Y, Cheng G, Chui CH, et al. ABO blood group and susceptibility to severe acute respiratory syndrome [published correction appears in *JAMA.* 2005 Aug 17;294(7):794. Cheng, Yufeng [corrected to Cheng, Yunfeng]]. *JAMA.* 2005;293(12):1450-1451. doi:10.1001/jama.293.12.1450-c.
28. Afoakwah R, Aubyn E, Prah J, Nwaefuna EK, Boampong JN. Relative Susceptibilities of ABO Blood Groups to Plasmodium falciparum Malaria in Ghana. *Adv Hematol.* 2016;2016:5368793. doi:10.1155/2016/5368793.
29. Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normark S. Attachment of Helicobacter pylori to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science.* 1993;262(5141):1892-1895. doi:10.1126/science.8018146.
30. Zhang XF, Tan M, Chhabra M, Dai YC, Meller J, Jiang X. Inhibition of histo-blood group antigen binding as a novel strategy to block norovirus infections. *PLoS One.* 2013;8(7):e69379. Published 2013 Jul 19. doi:10.1371/journal.pone.0069379.
31. Foster MT Jr, Labrum AH. Relation of infection with Neisseria gonorrhoeae to ABO blood groups. *J Infect Dis.* 1976;133(3):329-330. doi:10.1093/infdis/133.3.329.
32. Mu Y, Schulz BL, Ferro V. Applications of Ion Mobility-Mass Spectrometry in Carbohydrate Chemistry and Glycobiology. *Molecules.* 2018;23(10):2557. Published 2018 Oct 7. doi:10.3390/molecules23102557.
33. Rajendran K, Krishnasamy N, Rangarajan J, Rathinam J, Natarajan M, Ramachandran A. Convalescent plasma transfusion for the treatment of COVID-19: Systematic review [published online ahead of print, 2020 May 1]. *J Med Virol.* 2020;10.1002/jmv.25961. doi:10.1002/jmv.25961.
34. Li L, Zhang W, Hu Y, Tong X, Zheng S, Yang J, et al. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial. [published online ahead of print, 2020 Jun 3] [published correction appears in doi: 10.1001/jama.2020.13216]. *JAMA.* 2020;324(5):1-11. doi:10.1001/jama.2020.10044.
35. Onsten TG, Callegari-Jacques SM, Goldani LZ. The Higher Frequency of Blood Group B in a Brazilian Population with HIV Infection. *Open AIDS J.* 2013;7:47-50. Published 2013 Oct 18. doi:10.2174/1874613601307010047.
36. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature.* 2003;422(6929):307-312. doi:10.1038/nature01470.
37. Julmy F, Ammann RA, Taleghani BM, Fontana S, Hirt A, Leibundgut K. Transfusion efficacy of ABO major-mismatched platelets (PLTs) in children is inferior to that of ABO-identical PLTs. *Transfusion.* 2009;49(1):21-33. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01914.x.
38. Skogsberg U, Breimer ME, Friman S, Mjörnstedt L, Mölne J, Olausson M, et al. Successful ABO-incompatible liver transplantation using A2 donors. *Transplant Proc.* 2006;38(8):2667-2670. doi:10.1016/j.transproceed.2006.07.025.
39. Zhao J, Yang Y, Huang H, Li D, Gu D, Lu X, et al. Relationship between the ABO Blood Group and the COVID-19. *MedRxiv* 2020. [Epub antes da impressão]. DOI: 10.1101 / 2020.03.11.20031096.
40. Murugesan JR, Murugesan SP, Yip J, Hitos K, Fulham S, Engel A. Meta-analysis - perineural invasion as prognostic factor in rectal cancer. *J Coloproctol.* 2019;39(1):74-80. doi:10.1016/j.jcol.2018.09.001.
41. Greenhalgh T. How to read a paper: the basics of evidence-based Medicine. Chichester - UK: Wiley-Blackwell, 2006.

Correspondência

Alexandre Geraldo

Universidade do Vale do Itajaí (Univali)

Rua Uruguai, 458 - Centro

Itajaí-SC, Brasil

alexandregeraldo@univali.br

A corrida pela vacina em tempos de pandemia: a necessidade da imunização contra a COVID-19

The vaccine race in pandemic times: the need for immunization against COVID-19

Lillian Oliveira Pereira da Silva¹
Joseli Maria da Rocha Nogueira²

Resumo

Em dezembro de 2019, em Wuhan, China, foi detectada uma síndrome respiratória aguda epidêmica em humanos, causada por um novo coronavírus (SARS-CoV-2) de origem zoonótica. A grande velocidade de sua disseminação levou a OMS a declarar a situação pandêmica em março de 2020, sugerindo medidas de distanciamento entre as pessoas e a utilização de máscaras. A criação de uma vacina contra COVID-19 passou então a ser considerada a estratégia profilática mais eficaz para controle e prevenção desta doença. Cerca de 170 equipes em todo o mundo já estão realizando essa pesquisa e atualmente, aproximadamente 188 vacinas em diferentes fases do ensaio clínico já estão sendo desenvolvidas. Sete destas vacinas se destacam no cenário atual com bom potencial para serem disponibilizadas entre 2021 e 2022. O sucesso desses esforços dependerá de uma ação conjunta, incluindo o compromisso de todas as pessoas em evitar o contato entre si e fazerem uso da vacina quando estiver disponível, além da garantia de financiamento assegurado entre governos, iniciativa privada e, em última instância, do empenho dos fabricantes de vacinas para participar todos juntos, cada um fazendo sua parte, em uma escala grande o suficiente que forneça uma solução global para o final desta pandemia.

Palavras-chave

Vacina; COVID; Coronavírus

INTRODUÇÃO

Os Coronavírus fazem parte de um grupo de retrovírus que causa infecções respiratórias. Em dezembro de 2019, após um surto infeccioso de uma síndrome respiratória aguda de origem zoonótica, foi identificada em Wuhan, na China, a presença em humanos de uma mutação em um coronavírus, originando o SARS-CoV-2. Esse vírus tornou-se o causador da COVID-19 (do inglês, *coronavirus disease - 2019*), cuja velocidade da disseminação mostrou-se muito mais rápida do que outras viroses, levando a Organização Mundial da Saúde a declarar essa doença como pandemia três meses depois de sua descoberta, em março de 2020.⁽¹⁾ Os pacientes infectados são atualmente as principais fontes da doença, que pode ser transmitida por gotículas respiratórias e contato direto ou indireto.⁽²⁾

Dados publicados mostram que, em cerca de 80% dos casos, os infectados se apresentaram assintomáticos ou com sintomas relativamente leves, como febre, fadiga e alguns sinais respiratórios, incluindo a tosse, dor de garganta e falta de ar, enquanto que o restante (20%) apresentou quadros mais graves, evoluindo para pneumonias

severas e, em alguns casos, para o óbito.^(1,3) O coronavírus pode se manter incubado por cerca de 2 a 14 dias e, ainda assim, ser transmitido através de fômites ou da pulverização de gotículas por meio de tosse ou espirro, que são os sintomas mais comuns nos pacientes acometidos pela doença.⁽²⁾

Em meados de agosto de 2020, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), foram contabilizados cerca de 21.500.000 casos confirmados de COVID-19 e 771.500 mortes em todo o mundo. A mortalidade ocorre principalmente por pneumonia e falência de múltiplos órgãos, especialmente em idosos e pessoas que apresentam condições crônicas, como a hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes. No Brasil, a curva ainda se mostra progressiva (Figura 1), com 3.317.096 casos confirmados e 107.232 óbitos em 17 de agosto de 2020.⁽²⁾

Nos últimos anos, a indústria e a comunidade científica foram solicitadas para produzir vacinas de forma rápida e eficaz frente às epidemias de H1N1, Ebola, Zika e, atualmente, contra o vírus SARS-CoV-2.⁽⁴⁾ Bousada e Pereira afirmam que, salvo a utilização de água potável, as vacinas são o maior avanço da humanidade no combate

¹Especialização em Análises Clínicas - Fundação Técnico-Educacional Souza Marques (FTESM). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 14/08/2020
Artigo aprovado em 27/08/2020
10.21877/2448-3877.20200002

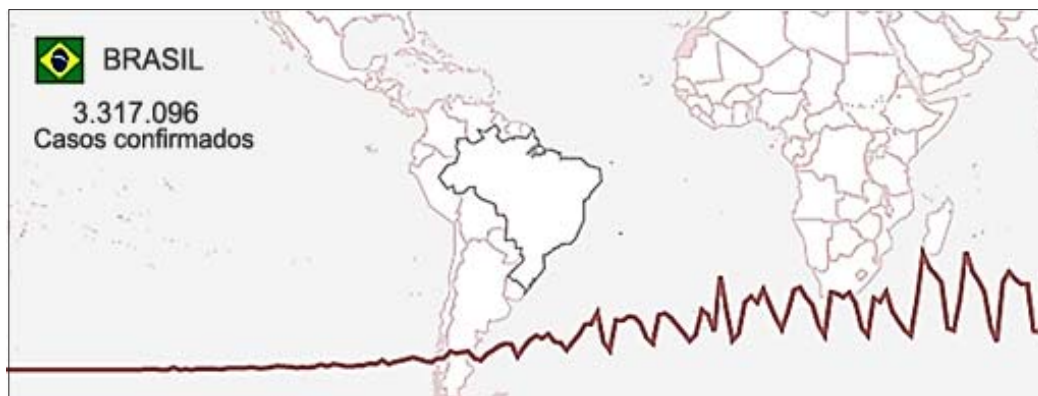


Figura 1. Curva de contaminação da COVID-19 no Brasil.

Fonte: WHO, 2020⁽²⁾

às doenças, tendo como princípio básico a exposição do organismo aos antígenos, substâncias presentes nos microrganismos, estimulando, assim, a produção de anticorpos através de uma resposta imunológica induzida sem que o indivíduo contraia a doença em questão. A imunização adquirida só se torna possível através da formação de células de memória, que, por sua vez, serão capazes de ativar os leucócitos após um novo contato com o antígeno.⁽⁵⁾

As vacinas surgiram ainda no século XVIII quando Edward Jenner descobriu a vacina antivariólica, onde comprovava que, ao inocular uma secreção de um paciente doente em outra pessoa saudável, esta última desenvolvia sintomas muito mais brandos e tornava-se imune. A vacina da varíola humana foi desenvolvida a partir de um tipo de varíola que acometia as vacas, já que Jenner notara que ordenhadores de vacas contaminadas acabavam imunes à varíola humana. A partir disso, a palavra vacina (do latim, *Vaccinum*, que significa "de vaca"), tornou-se correspondente aos inóculos que apresentam a capacidade de produzir anticorpos. As vacinas também se mostram extremamente úteis e mais efetivas no controle de doenças do que o uso de medicamentos, ou seja, trata-se de um método mais barato para a saúde coletiva atuar na prevenção de doenças.⁽⁶⁾

Tais vacinas podem ser classificadas de forma correspondente aos componentes utilizados para fabricá-la, como microrganismos inteiros, macromoléculas específicas e purificadas, vetores recombinantes, peptídeos sintéticos ou, até mesmo, o próprio material genético do patógeno, como o DNA.⁽⁵⁾ As vacinas virais, como as que são tratadas neste artigo, podem ser classificadas em atenuadas, inativadas ou oriundas de subunidades (Tabela 1).

O desenvolvimento de vacinas é um processo custoso, constituído de diversas etapas e que pode demorar anos para produzir uma única vacina licenciada, com diferentes análises de dados ou verificações do processo de fabricação, sendo divididos em três etapas.^(4,7,8) A primeira etapa do processo é correspondente à pesquisa básica, onde

novas propostas ocorrem. Já na segunda, são realizados os testes pré-clínicos (*in vitro e/ou in vivo*) no intuito de comprovar a segurança e o potencial imunogênico da vacina. Por último, na terceira etapa, ocorrem os ensaios clínicos, que são divididos em quatro fases (Tabela 2), sendo esta a etapa mais longa e financeiramente mais custosa.⁽⁸⁾

Tabela 1. Classificação de vacinas virais

Classificação	Definição	Exemplo
Vírus atenuado	O vírus se mantém ativo, porém, incapaz de causar doenças. Todavia, pode ocorrer uma reversão do vírus	Caxumba, febre amarela, poliomielite oral, rubéola e sarampo
Vírus inativado	Contém o vírus inativado por agentes químicos ou físico	Poliomielite injetável, hepatite A, gripe e raiva
Sub-unidades	Contém fragmentos do vírus (antígenos) purificados	Hepatite B e HPV

Adaptado de Bousada e Pereira, 2016 e Fiocruz, 2019.^(5,6)

Tabela 2. Fases do ensaio clínico

Fase	Descrição
Fase I	É o primeiro estudo a ser realizado em seres humanos. Seu objetivo é demonstrar a segurança da vacina
Fase II	Tem por objetivo estabelecer a sua imunogenicidade
Fase III	É a última fase de estudo antes da obtenção do registro sanitário. Tem o objetivo de demonstrar a eficácia da vacina
Fase IV	A vacina disponibilizada para a população. Ainda que tenha sido aprovada, a vacina continua sendo monitorada em busca de reações adversas inesperadas

Fonte: Instituto Butantan, 2019.⁽⁸⁾

Em janeiro de 2020, o material genético do novo coronavírus, o SARS-COV-2, foi sequenciado e publicado no meio acadêmico, permitindo assim que as buscas para uma vacina fossem iniciadas. Tendo em vista o impacto negativo da pandemia, diversas pesquisas foram iniciadas em todo o mundo e somente em março desse ano a primeira proposta de vacina entrou na fase de testes em

humanos.⁽⁹⁾ Mais de 170 equipes de pesquisadores estão tentando criar essas vacinas, todavia, mesmo que os testes em humanos comecem com brevidade e mesmo que transcorra tudo de forma adequada existem ainda muitas barreiras antes que a imunização global seja viável.⁽¹⁰⁾ Com base nesse cenário, o objetivo deste artigo é levantar o andamento das vacinas que estão sendo produzidas contra o causador da COVID-19.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir de uma busca refinada em fontes de dados como periódicos Capes e PubMed, realizou-se um levantamento de trabalhos relacionados com a produção de vacinas para a COVID-19, por meio da associação das palavras-chave "Vaccine", "COVID" e "Coronavírus". A pesquisa abrangeu trabalhos publicados desde março de 2020 até atualmente. A seleção dos artigos foi baseada na leitura dos títulos seguida dos resumos, e os trabalhos que apresentavam o enfoque correspondente foram lidos na íntegra, dando origem aos resultados deste artigo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como dito anteriormente, a corrida para o desenvolvimento da vacina contra o coronavírus avança de forma promissora. Atualmente, cerca de 188 vacinas estão sendo produzidas em todo o mundo. Ainda que, normalmente, sejam necessários anos de testes e um período ainda maior para a produção das mesmas, os pesquisadores pretendem desenvolver uma vacina eficaz no prazo de 12 a 18 meses.^(10,11) De acordo com o balanço da OMS, apenas seis das 188 vacinas que estão sendo pesquisadas estão na fase 3. Todavia, recentemente, a Rússia declarou publicamente que a vacina produzida em Moscou, pelo Instituto Gamaleya, que consta como fase 1 para a OMS, estava na reta final para ser liberada à população, totalizando sete vacinas em potencial (Tabela 3).⁽¹¹⁾

Vacina de Oxford

Pertencente à indústria farmacêutica AstraZeneca, em parceria com a Universidade de Oxford e a Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), a vacina se encontra na Fase 3 de testagem e está sendo aplicada em voluntários no Reino Unido, África do Sul e em cerca de 5 mil voluntários em São Paulo, Rio de Janeiro e Salvador. Os pesquisadores de Oxford afirmaram que a vacina é segura e capaz de induzir a resposta imunológica em humanos e, em junho deste ano, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) divulgou uma parceria com a Universidade de Oxford para auxiliar no desenvolvimento da vacina. É considerada pela OMS como um dos projetos mais promissores até o momento,

Tabela 3 - Vacinas em potencial

Fabricante	Parceria	Tipo de vacina	Número de doses estipulado
AstraZeneca	Universidade de Oxford UNIFESP	Vetor viral sem replicação	1
Moderna	NIAID	RNA	2
BioNTech / Pfizer	Fosun Pharma	RNA	2
SINOVAC	Instituto Butantã	Vírus inativado	2
SINOPHARM (2 vacinas)	Instituto de Produtos Biológicos de Wuhan	Vírus inativado	2
	Instituto de Produtos Biológicos de Pequim	Vírus inativado	2
Instituto Gamaleya	Contrato Acellena Pesquisa e desenvolvimento de drogas	Vetor viral sem replicação	1

Fonte: adaptado de WHO, 2020.⁽¹¹⁾

haja vista que seus estudos preliminares correspondentes às fases 1 e 2 mostraram que a vacina apresenta boa resposta imunológica. Este estudo está com sua conclusão prevista para final de outubro de 2021.^(11,12)

Vacina Moderna

A vacina Moderna, pertencente ao laboratório de mesmo nome, em parceria com a Autoridade de Pesquisa e Desenvolvimento Biomédico Avançado e o Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID), entrou em fase III no final de julho, sendo a primeira pesquisa implementada no programa americano contra o coronavírus. O estudo está sendo desenvolvido para avaliar principalmente a eficácia, segurança e imunogenicidade do mRNA-1273 para prevenir a COVID-19 por até dois anos após a segunda dose da vacina, sendo controlado por placebo em adultos acima de 18 anos. A previsão da conclusão do estudo é para outubro de 2022.^(11,13)

Vacina Pfizer & Biontech

A vacina desenvolvida pelas empresas Pfizer e Biontech (Alemanha e Estados Unidos, respectivamente) também se encontra na fase 3, além de apresentar uma aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*), o órgão regulador dos Estados Unidos. Essa vacina está sendo testada em voluntários brasileiros com idades entre 18 e 85 anos e, em julho, a testagem foi aprovada em São

Paulo e Salvador pela Anvisa. De acordo com os pesquisadores, o produto apresenta uma resposta imune robusta através da produção de anticorpos, citocinas e células T induzidas por uma nanopartícula lipídica (LNP) formulada com RNA mensageiro modificado com nucleosídeo do vírus, que codifica o domínio de ligação ao receptor da proteína correspondente ao SARS-CoV-2. A previsão da conclusão do estudo é para novembro de 2022.^(11,14,15)

Vacina CoronaVac

O Instituto Butantan, junto com a farmacêutica chinesa Sinovac, estabeleceram um acordo, em agosto, para produção e testes em estágio avançado da vacina CoronaVac, que contém o vírus inativado, permitindo a testagem em 9 mil voluntários em São Paulo e, caso seja comprovada sua eficácia e segurança, fornecimento de doses até junho de 2021.⁽¹⁶⁾ A vacina está sendo submetida a testes duplo-cego, randomizados e controlados por placebo de fase III. Ainda na fase II, a vacina se mostrou eficaz, induzindo a resposta imune do paciente de forma segura e tolerável, sem grandes efeitos adversos. Todavia, ainda não há uma previsão para a conclusão do estudo.⁽¹⁷⁾

Vacinas Sinopharm

A Sinopharm, empresa chinesa, realizou uma colaboração com o Instituto de Produtos Biológicos de Pequim e o de Wuhan, produzindo duas vacinas de vírus inativado, que estão sendo testadas nos Emirados Árabes, onde 15 mil pessoas devem participar como voluntárias. Desse total, 5 mil pessoas receberão a versão do Instituto Wuhan e outras 5 mil a do Instituto de Pequim. Os resultados das fases 1 e 2 sugerem que a vacina pode ser segura, tolerável e capaz de desencadear a produção de anticorpos de forma robusta. Todavia, ainda não se sabe se tal resposta é suficiente para a prevenção da COVID-19, haja vista que os autores declaram que não houve comparação dos resultados obtidos com o soro de pacientes contaminados, mas sim com a resposta de outros testes de vacinas, afirmando que os níveis estavam semelhantes às vacinas em desenvolvimento pela AstraZeneca, Biontech e Moderna, ainda que sejam metodologias diferentes. Além disso, o período de recrutamento de voluntários se estende até julho de 2021, portanto, acredita-se que os estudos sejam concluídos somente após esta data.^(11,18,19)

Vacina Sputnik V

De acordo com a base de dados da Organização Mundial da Saúde, a vacina produzida pelo Instituto Gamaleya, de Moscou (Rússia), também chamada de Sputnik V, não pode ser considerada em fase III, pois não

há dados publicados em revistas científicas que comprovem os métodos utilizados ou o número de voluntários, bem como a eficácia da mesma. Sendo assim, perante a OMS, a Sputnik V ainda está em fase I.⁽¹¹⁾ Mariângela Simão, Diretora-geral assistente da OMS, em uma entrevista, informou que a Rússia está repassando maiores informações sobre a vacina e, ainda que seja uma excelente proposta, dada a metodologia simplificada que está sendo utilizada, somente após os ensaios clínicos correspondentes e a análise dos dados é que será possível comprovar a eficácia e segurança da Sputnik V.⁽²⁰⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de todos os esforços globais que estão sendo realizados, e de algumas vacinas candidatas já estarem na fase 3, ainda não há garantia de que qualquer uma delas funcionará gerando uma resposta imune eficiente e com segurança. As vacinas potenciais que já estão em fase III devem ainda passar pela última fase do ensaio clínico. Isso é especialmente importante quando se trata de segurança, mesmo durante a emergência de uma pandemia, já que, nesse caso, a grande maioria da população irá se vacinar. Muitas pesquisas ainda precisam ser realizadas, pois já foi observada a grande capacidade de mutação deste vírus e já há relatos de possíveis casos de reinfecção. Se ainda nem sabemos se os anticorpos resultantes da infecção natural por esse vírus fornecem proteção e se esta é duradoura, imagine os anticorpos gerados pela imunização ativa. Além disso, a disposição do público em apoiar as medidas de quarentena adotadas pela saúde pública, incluindo o distanciamento social voluntário e a utilização de máscaras para diminuir a disseminação da COVID-19, nem sempre tem sido adequada em todos os países. Portanto, concluímos que o sucesso do controle desta pandemia não depende de somente um fator, e sim de um conjunto de ações combinadas, incluindo um pacto social pela prevenção da disseminação e, também, da garantia de financiamento suficiente congregando governos, iniciativa privada, fabricantes de vacinas e o próprio povo, para uma conscientização integrada, buscando um desfecho onde haja proteção para todos. Somente esse esforço conjunto levará a uma solução global para o final desta pandemia.

Abstract

In December 2019 in Wuhan, China, an acute epidemic respiratory syndrome in humans was detected, caused by a new coronavirus (SARS-CoV-2) of zoonotic origin. The great speed of its dissemination, led the WHO to declare the pandemic situation in March 2020, suggesting measures of distance between people and the use of masks. The creation of a vaccine against COVID-19, then came to be considered the most effective prophylactic strategy for the control and prevention of this disease. About 170 teams worldwide are already carrying out this research and currently, approximately 188 vaccines in different phases of the clinical trial are already being developed. Seven of these

vaccines stand out in the current scenario with good potential to be made available between 2021 and 2022. The success of these efforts will depend on joint action, including the commitment of all people to avoid contact with each other and to use the vaccine when it is available, as well as the secured financing between governments and private sector

Keywords

Vaccine; COVID; Coronavirus

REFERÊNCIAS

1. WHO. Global research on coronavirus disease (COVID-19). World Health Organization, mar./2020. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov>. Acesso em: 10 ago. 2020.
2. WHO. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard Data. World Health Organization, ago./2020. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 13 ago. 2020.
3. Prompetchara E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2020 Mar;38(1):1-9. doi: 10.12932/AP-200220-0772.
4. Lurie N, Saville M, Hatchett R, Halton J. Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed. *N Engl J Med*. 2020 May 21; 382(21):1969-1973. doi: 10.1056/NEJMp2005630. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp2005630>. Acesso em: 13 ago. 2020.
5. Bousada GM, Pereira EL. Produção de vacinas virais Parte I: Engenharia de bioprocessos. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três corações*, v. 15, n. 1, p. 309-332, jul./2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v15i1.4038>.
6. Fiocruz. Vacinas virais. Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, fev./2019. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-vacinas-menu-topo/131-plataformas/1574-vacinas-virais>. Acesso em: 13 ago. 2020.
7. Gouglas D, Le TT, Henderson K, Kaloudis A, Danielsen T, Hammersland NC, et al. Estimating the cost of vaccine development against epidemic infectious diseases: a cost minimisation study. *Lancet Glob Health*. 2018 Dec;6(12):e1386-e1396. doi: 10.1016/S2214-109X(18)30346-2.
8. Instituto Butantan. Ensaios clínicos. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos>. Acesso em: 13 ago. 2020.
9. Le TT, Andreadakis Z, Kumar A, Román RG, Tollefsen S, Saville M, Mayhew S. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov*. 2020 May;19(5):305-306. doi: 10.1038/d41573-020-00073-5.
10. Kommenda N, Hulley-Jones F. Covid vaccine tracker: when will we have a coronavirus vaccine? *The Guardian*, ago./2020. Disponível em: <https://www.theguardian.com/world/ng-interactive/2020/aug/14/covid-vaccine-tracker-when-will-we-have-a-coronavirus-vaccine>. Acesso em: 14 ago. 2020.
11. WHO. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines. World Health Organization, ago./2020. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/novel-coronavirus-landscape-covid-19>. Acesso em: 14 ago. 2020.
12. Astrazeneca; Oxford. A phase III study to investigate a vaccine against COVID-19. *ISRCTN registry*, mai./2020. Disponível em: <http://www.isrctn.com/ISRCTN89951424>. Acesso em: 13 ago. 2020.
13. Moderna TX, et al. A Study to Evaluate Efficacy, Safety, and Immunogenicity of mRNA-1273 Vaccine in Adults Aged 18 Years and Older to Prevent COVID-19. *ClinicalTrials.gov*, jul./2020. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04470427?term=vaccine&cond=covid-19&draw=5>. Acesso em: 14 ago. 2020.
14. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. Concurrent human antibody and TH1 type T-cell responses elicited by a COVID-19 RNA vaccine. *medRxiv*, jul./2020. Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.07.17.20140533v1.full.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.17.20140533>.
15. Biontech; Pfizer. Study to Describe the Safety, Tolerability, Immunogenicity, and Efficacy of RNA Vaccine Candidates Against COVID-19 in Healthy Adults. *ClinicalTrials.gov*, Estados Unidos, v. 1, n. 1, p. 1-1, abr./2020. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04368728?term=vaccine&cond=covid-19&draw=3>. Acesso em: 14 ago. 2020.
16. Instituto Butantan. Butantan e Governo de SP vão testar e produzir vacina inédita contra coronavírus. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br/noticias/butantan-e-governo-de-sp-vaio-testar-e-produzir-vacina-inedita-contra-coronavirus>. Acesso em: 14 ago. 2020.
17. Sinovac; Butantan. Clinical Trial of Efficacy and Safety of Sinovac's Adsorbed COVID-19 (Inactivated) Vaccine in Healthcare Professionals (PROFISCOV). *ClinicalTrials.gov*, jul./2020. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04456595?term=vaccine&cond=covid-19&draw=2>. Acesso em: 13 ago. 2020.
18. Taylor NP. Sinopharm shares phase 2 data on inactivated COVID-19 vaccine. *Fierce Biotech*, ago./2020. Disponível em: <https://www.fiercebiotech.com/biotech/sinopharm-shares-phase-2-data-inactivated-covid-19-vaccine>. Acesso em: 14 ago. 2020.
19. Xia S, Duan K, Zhang Y, Zhao D, Zhang H, Xie Z, et al. Effect of an Inactivated Vaccine Against SARS-CoV-2 on Safety and Immunogenicity Outcomes: Interim Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. [published online ahead of print, 2020 Aug 13]. *JAMA*. 2020;e2015543. doi:10.1001/jama.2020.15543. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2769612>. Acesso em: 14 ago. 2020.
20. Rádio Bandeirantes. Rússia mostra dados da vacina Sputnik V à OMS. Disponível em: <https://www.band.uol.com.br/noticias/16305761/russia-mostra-dados-da-vacina-sputnik-v-a-oms>. Acesso em: 13 ago. 2020.

Correspondência

Joseli Maria da Rocha Nogueira
Departamento de Ciências Biológicas
Escola Nacional de Saúde Pública
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)
Rio de Janeiro-RJ, Brasil
joseli@ensp.fiocruz.br

COVID-19 e Diabetes: a relação entre duas pandemias distintas

COVID-19 and Diabetes: two distinct pandemics and their relationship

Mauren Isfer Anghebem^{1,2}

Fabiane Gomes de Moraes Rego¹

Geraldo Picheth¹

Resumo

O mundo enfrenta duas pandemias distintas, mas que guardam alguma relação entre si. O *Diabetes mellitus* (DM) promove um estado crônico inflamatório que torna os afetados mais propensos a infecções em geral. A doença aguda causada pelo novo coronavírus, COVID-19, assim como o DM, altera o sistema imunológico, podendo ativar uma tempestade de citocinas deletéria ao hospedeiro. O DM tem sido considerado como um fator de risco independente da idade para a gravidade da COVID-19. De fato, pessoas com DM são propensas a um curso clínico de maior severidade da COVID-19 com maior taxa de morbimortalidade. Uma forte relação entre a COVID-19 e o DM reside no fato de que o SARS-CoV-2 utiliza a proteína ACE-2 como receptor para entrar na célula humana, a qual é superexpressa pelas células das ilhotas pancreáticas e ainda mais em pessoas com DM. Depois de invadir a célula do hospedeiro, o vírus degrada a ACE-2, reduzindo sua atividade anti-inflamatória. Somado a isso, acredita-se que o SARS-CoV-2 afete diretamente a parte endócrina do pâncreas, com conseqüente hiperglicemia. Entretanto, ainda não está claro de que forma as alterações glicêmicas podem estar relacionadas com a severidade da COVID-19; e se o SARS-CoV-2 tem potencial diabetogênico. Todavia, os mecanismos propostos para explicar a associação observada entre DM e a COVID-19 incluem inflamação, alterações na resposta imune, na coagulação e a agressão direta do vírus às células β pancreáticas. Como o diabetes está associado às manifestações graves da COVID-19, o primeiro passo é evitar a contaminação de pessoas com DM pelo SARS-CoV-2. Depois, todo paciente com COVID-19 que tenha DM deve ser considerado grave. E, por fim, a monitoração glicêmica frequente em pacientes com COVID-19 deve ser considerada, uma vez que o controle da hiperglicemia tem se mostrado eficaz na promoção de melhores desfechos clínicos.

Palavras-chave

COVID-19; Diabetes; pandemia

INTRODUÇÃO

O mundo enfrenta uma nova pandemia viral, responsável pela doença coronavírus-19 – COVID-19, e permanece lutando contra outra, bem mais antiga, o *Diabetes mellitus* (DM). Estima-se que mais de 460 milhões de pessoas no mundo apresentem DM e que o número de afetados deve aumentar 50% em vinte anos.⁽¹⁾ Concomitantemente, no presente, temos registrados quase 9 milhões de casos confirmados da COVID-19 no mundo e este número permanece crescendo.⁽²⁾ São duas pandemias em curso, as quais guardam relações entre si.

As infecções humanas por coronavírus são conhecidas há décadas, em especial a síndrome respiratória aguda grave (SARS) e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS). No entanto, a partir de dezembro de 2019, um

novo coronavírus – SARS-CoV-2, passa a circular no mundo, causando a COVID-19.^(3,4)

O espectro clínico da COVID-19 tem se mostrado bastante variado e abrangente, desde uma infecção assintomática até manifestações severas que podem culminar em síndrome do desconforto respiratório agudo grave e morte. Sugere-se que os casos graves tenham relação com fatores de risco como hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares, embora diversos aspectos sobre a fisiopatologia da doença, a evolução clínica e o padrão de resposta imunológica ainda não tenham sido totalmente elucidados.^(5,6)

A infecção por SARS-CoV-2 pode ativar respostas imunes inatas e adaptativas. Contudo, resposta inflamatória inata descontrolada e resposta imune adaptativa prejudicada podem resultar em danos teciduais, tanto em sítio

¹Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, Brasil.

²Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba-PR, Brasil.

Instituição: Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, Brasil.

Recebido em 28/07/2020

Artigo aprovado em 12/08/2020

10.21877/2448-3877.20200001

específico quanto de forma sistêmica. Muitos pacientes com infecção severa por COVID-19 exibem concentrações séricas expressivamente elevadas de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 (interleucina-6) e IL-1 β , bem como IL-2, IL-8, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IP10, MCP1, MIP1 α (também conhecido como CCL3) e TNF. A ativação conjunta destas múltiplas citocinas tem sido descrita como a “tempestade perfeita” para o processo inflamatório.⁽⁷⁻¹⁰⁾

A hiperglicemia crônica, característica do diabetes, em conjunto com outras alterações metabólicas nesta patologia, concorre para alterações imunológicas e um ambiente inflamatório que favorece infecções severas e de difícil tratamento.⁽¹¹⁾ Evidências científicas têm mostrado que, de fato, pacientes com DM internados com COVID-19 apresentam longo período de internação hospitalar, complicações graves da doença e maior mortalidade quando comparados a pacientes não diabéticos com COVID-19.⁽¹²⁾

Este estudo destaca aspectos da relação entre COVID-19 e o diabetes.

Entrada do SARS-CoV-2 na célula humana

O genoma do SARS-CoV-2 apresenta 79% de similaridade com o genoma do SARS-CoV, causador da SARS; entretanto, eles são suficientemente divergentes para que o primeiro tenha sido caracterizado como um novo beta coronavírus. Ao verificar a semelhança estrutural dos domínios de ligação ao receptor do SARS-CoV e do SARS-CoV-2, pesquisadores sugeriram que o novo coronavírus, assim como o SARS-CoV, pudesse usar a proteína transmembrana ACE-2 (do inglês, *angiotensin-converting enzyme 2*, ou enzima conversora de angiotensina 2) como receptor para a entrada na célula.⁽¹³⁻¹⁷⁾

A entrada do SARS-CoV-2 nas células humanas que expressam a ACE-2 é mediada pela glicoproteína *spike* (S) do envelope viral. Em todos os betacoronavírus, uma única região da proteína S, denominada domínio de ligação ao receptor (RBD), medeia a interação com o receptor da célula hospedeira. A afinidade entre ACE-2 e o RBD do SARS-CoV-2 é dez a vinte vezes maior quando comparada com o RBD do SARS-CoV.⁽¹⁸⁾ Esta expressiva afinidade é um dos fatores responsáveis pela rápida expansão do vírus.

A proteína S é dividida em dois domínios, subunidades ou regiões: S1, que é responsável pela ligação do vírus ao receptor celular, e S2, responsável pela fusão das membranas viral e celular.⁽¹⁵⁾ Depois de ligar o receptor, uma protease da célula hospedeira cliva a proteína S, que libera peptídeos de fusão, facilitando a entrada de vírus.⁽¹⁹⁾ Esse mecanismo requer a ativação da proteína S pelas proteases das células hospedeiras, o que implica a clivagem da proteína S no limite dos domínios S1 e S2 ou no domínio S2. O processo de clivagem ocorre em duas etapas; a primeira

clivagem é feita pela protease furina para que os vírus recém-formados possam usar a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) para a clivagem adicional da proteína S e internalização do víon.⁽²⁰⁾

Como as células epiteliais alveolares apresentam elevada expressão de ACE-2 e TMPRSS2, elas foram apontadas como a principal porta de entrada do SARS-CoV-2 no pulmão, órgão preferencialmente agredido na COVID-19.⁽²⁰⁾ No entanto, os receptores ACE-2 também são expressos em outras células, como as intestinais, hepáticas, renais,⁽²¹⁾ e superexpressos nas células β pancreáticas, que produzem insulina.⁽²²⁾ Logo, é plausível que a infecção pelo novo coronavírus afete o metabolismo da glicose e possa complicar quadros de DM ou mesmo desencadeá-lo.

Diabetes mellitus e COVID-19

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta e/ou incapacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos, resultando em hiperglicemia crônica.⁽²³⁾ O quadro hiperglicêmico favorece vias metabólicas responsáveis pela formação de produtos finais de glicação avançada, AGEs (do inglês, *Advanced Glycation End-Products*), liberação de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo.⁽²⁴⁾ Este ambiente inflamatório torna pacientes com DM mais propensos a infecções, com piores desfechos.⁽¹¹⁾ Enquanto que a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares em pessoas com DM tem reduzido, a pneumonia tem se destacado como causa de morte, com diferentes agentes etiológicos envolvidos.⁽²⁵⁾

Os casos de maior gravidade e os casos fatais de COVID-19 ocorrem em pessoas mais velhas e com comorbidades como diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, câncer, doenças pulmonares crônicas.⁽²⁶⁾

Uma metanálise envolvendo 33 estudos e 16.003 participantes mostrou que pacientes com DM e COVID-19 têm maior risco de severidade, com razão de chance de 2,75 (IC 95%: 2,09 e 3,62; $p < 0,01$) quando comparados àqueles com COVID-19 e sem DM; e têm maior risco de mortalidade, com uma razão de chance de 1,90 (IC 95%: 1,37 e 2,64; $p < 0,01$). A prevalência de DM em pacientes com COVID-19 foi de 9,8% (IC 95%: 8,7% e 10,9%), após ajuste de heterogeneidade.⁽²⁷⁾

Durante os surtos de SARS em 2003 (SARS-CoV), a hiperglicemia foi um preditor independente de mortalidade e morbidade. Mesmo pacientes sem DM e com quadros leves de SARS, sem uso de corticosteroides durante o percurso da infecção, apresentaram concentrações elevadas de glicemia em jejum no primeiro dia de internamento quando comparados aos pacientes internados com suspeita de SARS, mas que depois tiveram diagnóstico de

pneumonia causada por outros agentes.⁽²⁸⁾ Na atual pandemia de COVID-19 existem estudos apontando o DM como preditor independente de mortalidade entre os pacientes com COVID-19.^(29,30) Esta associação, entretanto, não foi corroborada em outras publicações, o que torna este tema ainda em disputa por novas evidências.^(31,32)

Durante a lesão pulmonar aguda, a ACE-2 alveolar parece estar sub-regulada (menor atividade). Isso diminuiria o metabolismo da angiotensina II, resultando em concentrações locais mais elevadas dessa proteína, o que aumenta a permeabilidade alveolar e promove a lesão pulmonar.⁽³³⁾ Apesar de não ser totalmente conhecida a razão pela qual pessoas com DM desenvolvem formas mais severas de COVID-19, além da participação do sistema imune, fica a esclarecer se a participação da ACE-2 é relevante para o processo.⁽²⁵⁾

ACE-2 e ACE, embora homólogas, exercem funções distintas no sistema renina-angiotensina-aldosterona. Enquanto que a ACE converte a angiotensina I em angiotensina II, promovendo vasoconstrição e aumento da pressão arterial, a ação da ACE-2, por sua vez, reduz a quantidade de angiotensina I, que é transformada no vasoconstritor angiotensina II pela ACE, resultando em vasodilatação e redução da pressão arterial. Isto é, a ACE-2 compete com ACE na transformação da angiotensina I ao transformá-la em angiotensina 1-9. ACE-2 ainda tem a função de degradar a angiotensina II em angiotensina 1-7, que age na via do receptor *Mas*, ocasionando respostas anti-inflamatórias.⁽³⁴⁾

O SARS-CoV afeta a parte endócrina do pâncreas com conseqüente hiperglicemia, possivelmente pela superexpressão de ACE-2 pelas células das ilhotas pancreáticas, estas responsáveis por hormônios como a insulina, que controla a glicemia.⁽²²⁾ O mesmo ocorre nas infecções pelo SARS-CoV-2, que entra na célula humana utilizando o mesmo receptor ACE-2. Pacientes com DM têm aumento na expressão de ACE-2, o que pode ser um fator predisponente à infecção pelo SARS-CoV-2.⁽³⁵⁾

Múltiplos efeitos, ainda pendentes de estudos mais robustos, como a glicação da ACE-2 ampliada pela hiperglicemia crônica, ou mesmo uma ação direta do SARS-CoV-2 modificando a atividade desta enzima, podem ser as causas do gatilho final para o estado de hiperinflamação e hipercoagulabilidade em pacientes com DM e COVID-19.^(31,36,37)

Bode e colaboradores (2020) avaliaram 1.122 pacientes internados com COVID-19 em 88 hospitais americanos, sendo 451 pacientes com DM (hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$) ou hiperglicemia transitória (duas ou mais glicemias > 180 mg/dL em um período de 24 horas e com hemoglobina glicada $< 6,5\%$) e 671 pacientes sem alterações glicêmicas. Interessante foi o fato de que os pacientes com hiperglicemia transitória tiveram taxas maio-

res de mortalidade e ficaram hospitalizados por um período mais longo entre a admissão e a morte do que os pacientes com DM, sugerindo que a hiperglicemia aguda, *per se*, seja um fator de risco independente para mortalidade por COVID-19, por afetar de forma mais agressiva o sistema imune.⁽¹²⁾

De fato, o estado hiperglicêmico é responsável pela ativação anormal do sistema imunológico, com: a) imunidade mediada por células inatas prejudicada; b) comprometimento da fagocitose pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos; c) comprometimento da quimiotaxia dos neutrófilos e sua atividade bactericida; e d) liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Estas alterações na imunidade inata favorecem as infecções severas em pessoas com DM.^(12,25) De maneira similar, os casos graves de COVID-19 são caracterizados por uma “tempestade de citocinas” deletéria ao hospedeiro, com superativação da via fator nuclear kappa B (NF- κ B).⁽³⁾

Estudos *in vitro* mostraram que a exposição das células epiteliais pulmonares a altas concentrações de glicose aumenta significativamente o risco de infecção pelo vírus Influenza, indicando que a hiperglicemia pode aumentar a replicação viral *in vivo*.⁽³⁸⁾ Contudo, embora o DM tenha sido associado a piores desfechos em pacientes com COVID-19, a suscetibilidade aumentada à infecção por SARS-CoV-2 em pessoas com diabetes ainda é discutida.^(39,40)

As características inflamatórias do DM e da COVID-19 desencadeiam também o desequilíbrio entre o processo de coagulação e a fibrinólise, com concentrações aumentadas dos fatores de coagulação (prolongamento do tempo de protrombina) e inibição relativa do sistema fibrinolítico. A resistência à insulina, característica do diabetes tipo 2 (DM2), está associada à disfunção endotelial e aumento da agregação e ativação plaquetária. Essas anormalidades favorecem o desenvolvimento de um estado pró-trombótico hipercoagulável.⁽⁴¹⁾

Outro fator pode contribuir para o aumento do risco e da gravidade da infecção pelo SARS-CoV-2 no diabetes. O DM está associado a um aumento da protease furina, envolvida na entrada do SARS-CoV-2 na célula humana.⁽⁴²⁾ A endoprotease furina está associada à clivagem da proteína S (S1/S2) do SARS-CoV-2, e esta clivagem é requerida para a eficiente fusão do vírus com a célula hospedeira.⁽²⁰⁾

A base fisiopatológica de ambas as pandemias, DM e COVID-19, justifica a dosagem de marcadores laboratoriais de inflamação em pacientes com esta doença. Na hiperinflamação e nos casos severos da COVID-19 é esperado um aumento de IL-6, proteína C reativa, dímero D, ferritina sérica e VHS, prolongamento do tempo de protrombina – TP, e redução na contagem de plaquetas, entre outras alterações. As concentrações de IL-6, fibrinogênio, proteína C reativa e dímero D são significativamen-

te superiores em pacientes com COVID-19 na presença do DM, quando comparados àqueles sem DM.^(25,43,44)

As atividades plasmáticas das enzimas lactato desidrogenase (LD), alanina aminotransferase (ALT ou TGP) e gama-glutamiltransferase (GGT) têm se apresentado elevadas em pacientes com pneumonia por SARS-CoV-2, e têm sido reportadas atividades ainda mais elevadas quando os infectados apresentam DM ao serem comparados aos pacientes com COVID-19 sem diabetes. Pacientes com DM e COVID-19 apresentam concentrações reduzidas de proteína total, albumina, pré-albumina e hemoglobina, indicando uma maior probabilidade de desnutrição destes pacientes durante o curso do processo viral.⁽⁶⁾

SARS-CoV-2: gatilho para o DM?

É conhecido que alguns vírus têm relação com o desenvolvimento e complicações do DM, como o vírus da Hepatite C,⁽⁴⁵⁾ vírus da encefalomiocardite, o Coxsackie B vírus^(46,47) e o SARS-CoV.⁽²²⁾

O novo coronavírus, SARS-CoV-2, causa agressão direta às células das ilhotas pancreáticas.⁽⁴⁸⁾ É plausível, portanto, que este vírus promova alterações no metabolismo e na homeostasia da glicose e favoreça o início do DM em indivíduos susceptíveis, ou amplie a severidade das complicações associadas ao diabetes já manifesto.⁽⁴⁹⁾ Entretanto, ainda não há evidências robustas para sustentar a hipótese de um potencial efeito diabetogênico da COVID-19.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A COVID-19 e o DM são duas pandemias distintas. A primeira é nova, pouco conhecida, aguda e com elevado grau de transmissibilidade. O diabetes é uma das mais antigas patologias conhecidas, uma síndrome crônica, não transmissível, com predisposição genética, que em tempos atuais se converteu em pandemia global. Ambas, contudo, exigem cuidados específicos.

Pessoas com diabetes têm risco aumentado para infecções severas produzidas por diferentes agentes, incluindo o SARS-CoV-2. Os mecanismos propostos para explicar a associação entre DM e COVID-19 incluem um processo inflamatório exacerbado, alterações na coagulação e na resposta imune, e agressão direta do SARS-CoV-2 às células das ilhotas pancreáticas, responsáveis pela regulação glicêmica.⁽⁴⁸⁾

Importante destacar que o tipo do diabetes pode ser relevante no estudo desta patologia com a COVID-19. Embora tanto o diabetes tipo 1 (DM1) quanto o DM2 sejam caracterizados por hiperglicemia crônica, são duas entidades patológicas distintas, de etiologia múltipla e poligênica.⁽⁵⁰⁾ O DM1 é uma doença autoimune caracterizada pela

destruição das células beta pancreáticas mediada por anticorpos. No DM2, caracterizado por resistência à insulina e forte associação à obesidade, ocorre aumento da secreção de fatores pró-inflamatórios e citocinas por ativação crônica da resposta inata. Ambas as condições, DM1 e DM2, podem estar associadas à resposta imune exacerbada identificada em pacientes com DM e COVID-19.^(51,52)

Os dados disponíveis até o momento não diferenciam os tipos de DM em suas relações com a COVID-19, dificultando as contribuições e comparações da síndrome metabólica preexistente no DM2 contra quadros de hiperglicemia sem outros distúrbios metabólicos concomitantes, como acontece no DM1. Dados retrospectivos sobre a prevalência de infecção em diabetes sugerem que as pessoas com DM1 apresentam maior risco de infecções em geral quando comparados à DM2, embora a taxa de mortalidade seja semelhante.⁽³⁶⁾

Na presença do diabetes e COVID-19, a hidratação adequada também deve ser garantida e cuidadosamente monitorada, e, em especial para pacientes com DM1 com picos hiperglicêmicos e febre; a presença de cetonúria também deve ser avaliada com frequência.⁽⁵³⁾

Pacientes com DM hospitalizados com a forma grave de COVID-19 precisam de monitoração glicêmica frequente e perene durante todo o tempo de internamento. O controle glicêmico rígido pode ser um aliado importante na limitação da replicação viral e duração da COVID-19 em pacientes com diabetes.⁽³⁶⁾ Estudos recomendam que o controle da hiperglicemia seja realizado, preferencialmente, com insulina, evitando o uso de metformina e dos inibidores do cotransportador sódio-glicose 2 (SGLT2), como a canagliflozina, dapagliflozina e empagliflozina.⁽⁵³⁾

Não há dados disponíveis sobre o manejo mais apropriado de pacientes com diabetes infectados por SARS-CoV-2, bem como pacientes com COVID-19 que desenvolvem descompensação da glicemia. Monitoramento rigoroso da glicose e avaliação cuidadosa das interações medicamentosas podem atenuar o agravamento de sintomas e efeitos adversos. Embora a hiperglicemia geralmente constitua a principal preocupação neste contexto, não se deve descartar a possibilidade de episódios hipoglicêmicos como resultado da interação entre tratamento medicamentoso, patogênese viral e distúrbios metabólicos típicos do DM. As estratégias terapêuticas e as metas ideais de controle da glicemia devem ser formuladas com base na gravidade da doença, idade, presença de comorbidades e complicações relacionadas ao diabetes e outros fatores. Uma abordagem de equipe multidisciplinar, incluindo infectologistas, endocrinologistas, pneumologistas, psicólogos, farmacêuticos, nutricionistas e fisioterapeutas pode ser necessária durante os períodos prolongados de hospitalização e recuperação. Atenção especial deve ser dada àqueles com nefropatia diabética ou complicações cardíacas.

cas relacionadas ao DM, pois eles também correm um risco maior de desenvolver a forma grave de COVID-19 e morte.^(26,32) Finalmente, maior vigilância dos pacientes ambulatoriais com DM, bem como redução do tempo de hospitalização de pacientes com DM, podem ter impacto positivo em seus resultados.

A COVID-19 é um elemento novo ao diagnóstico. Embora o conhecimento das características do vírus e da sua virulência esteja avançando rapidamente, muito necessita ainda a ser descoberto. A interação entre a COVID-19 e o diabetes seguramente amplia o campo da pesquisa, onde novas descobertas serão necessárias para responder as perguntas que se avolumam sem respostas.

Abstract

The world faces two distinct pandemics, which have some relationship with each other. Diabetes mellitus (DM) promotes a chronic inflammatory state that makes the affected more prone to general infections. The acute disease caused by the new coronavirus, COVID-19, as well as DM, alters the immune system, which can activate a harmful cytokine storm in the host. DM has been considered as an age-independent risk factor for the severity of COVID-19. In fact, people with DM are prone to a more severe clinical course of COVID-19 with a higher rate of morbidity and mortality. A strong relationship between COVID-19 and DM lies in the fact that SARS-CoV-2 uses the ACE-2 protein as a receptor to enter the human cell, which is overexpressed by pancreatic islet cells, especially in people with DM. After invading the host cell, the virus degrades ACE-2, reducing its anti-inflammatory activity. In addition, SARS-CoV-2 is believed to directly affect the endocrine part of the pancreas, with consequent hyperglycemia. However, it is not clear how glycemic changes may be related to the severity of COVID-19; and, whether SARS-CoV-2 has diabetogenic potential. However, the mechanisms proposed to explain the observed association between DM and COVID-19 include inflammation, changes in the immune response, coagulation and direct aggression of the virus to pancreatic beta cells. As diabetes is associated with severe manifestations of COVID-19, the first step is to avoid contamination of people with DM by SARS-CoV-2. Then, every patient with COVID-19 who has DM should be considered severe. Finally, frequent glycemic monitoring in patients with COVID-19 should be considered, since the control of hyperglycemia has been shown to be effective in promoting better clinical outcomes.

Keywords

COVID-19; Diabetes; Pandemic.

REFERÊNCIAS

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. (International Diabetes Federation, 2019).
2. World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. (2020).
3. Hirano T, Murakami M. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity* (2020) doi:10.1016/j.immuni.2020.04.003.
4. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* (2020) doi:10.1038/s41591-020-0820-9.
5. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020 Mar 28; 395(10229):1054-1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3. Erratum in: *Lancet.* 2020 Mar 28;395(10229):1038.

6. Guo W, Li M, Dong Y, Zhou H, Zhang Z, et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. *Diabetes Metab Res Rev.* 2020 Mar 31:e3319. doi:10.1002/dmrr.3319.
7. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
8. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020 Jul 28;71(15):762-768. doi: 10.1093/cid/ciaa248.
9. Tan M, Liu Y, Zhou R, Deng X, Li F, Liang K, et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology.* 2020 Jul;160(3):261-268. doi: 10.1111/imm.13223.
10. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* 2020 Apr;8(4):420-422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
11. Moutschen MP, Scheen AJ, Lefebvre PJ. Impaired immune responses in diabetes mellitus: Analysis of the factors and mechanisms involved. Relevance to the increased susceptibility of diabetic patients to specific infections. *Diabete Metab.* 1992 May-Jun;18(3):187-201.
12. Bode B, Garrett V, Messler J, McFarland R, Crowe J, Booth R, Klonoff DC. Glycemic Characteristics and Clinical Outcomes of COVID-19 Patients Hospitalized in the United States. *J Diabetes Sci Technol.* 2020 Jul;14(4):813-821. doi: 10.1177/1932296820924469.
13. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003 Nov 27;426(6965):450-4. doi: 10.1038/nature02145.
14. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020 Feb 22;395(10224):565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
15. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
16. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell.* 2020 May 14;181(4):894-904.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.03.045.
17. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int. J Oral Sci.* 2020 Feb 24;12(1):8. doi:10.1038/s41368-020-0074-x.
18. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263 doi: 10.1126/science.aax0902.
19. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol.* 2020 Apr;5(4):562-569. doi: 10.1038/s41564-020-0688-y.
20. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol Cell.* 2020 May 21;78(4):779-784.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.
21. Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol.* 2004 Jun;203(2):631-7. doi:10.1002/path.1570.
22. Yang JK, Lin SS, Ji XJ, Guo LM. Binding of SARS coronavirus to its receptor damages islets and causes acute diabetes. *Acta Diabetol.* 2010 Sep;47(3):193-9. doi:10.1007/s00592-009-0109-4.

23. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020 (2019).
24. Anghebem-Oliveira MI, Souza EM, Pedrosa FO, Réa RR, Alves ASC, Picheth G, Rego FGM. RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. *Bras. Patol. Med. Lab.* [Internet]. 2013 Apr;49(2):97-108. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442013000200004>.
25. Ma RCW, Holt RIG. COVID-19 and diabetes. *Diabet Med.* 2020 May;37(5):723-725. doi: 10.1111/dme.14300.
26. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020 Apr 30;382(18):1708-1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
27. Kumar A, Arora A, Sharma P, Anikhindi SA, Bansal N, Singla V, et al. Is diabetes mellitus associated with mortality and severity of COVID-19? A meta-analysis. *Diabetes Metab Syndr.* 2020 Jul-Aug;14(4):535-545. doi: 10.1016/j.dsx.2020.04.044.
28. Yang JK, Feng Y, Yuan MY, Yuan SY, Fu HJ, Wu BY, et al. Plasma glucose levels and diabetes are independent predictors for mortality and morbidity in patients with SARS. *Diabet Med.* 2006 Jun; 23(6): 623-8 doi:10.1111/j.1464-5491.2006.01861.x.
29. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72,314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA.* 2020 Apr 7;323(13):1239-1242. doi:10.1001/jama.2020.2648.
30. Chen Y, Yang D, Cheng B, Chen J, Peng A, Yang C, et al. Clinical Characteristics and Outcomes of Patients With Diabetes and COVID-19 in Association With Glucose-Lowering Medication. *Diabetes Care.* 2020 Jul;43(7):1399-1407. doi:10.2337/dc20-0660.
31. Tadic M, Cuspidi C, Sala C. COVID-19 and diabetes: Is there enough evidence? *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2020 Jun;22(6):943-948. doi:10.1111/jch.13912.
32. Zhang JJ, Dong X, Cao YY, Yuan YD, Yang YB, Yan YQ, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy.* 2020 Jul;75(7):1730-1741. doi:10.1111/all.14238.
33. Bornstein SR, Dalan R, Hopkins D, Mingrone G, Boehm BO. Endocrine and metabolic link to coronavirus infection. *Nat Rev Endocrinol.* 2020 Jun;16(6):297-298. doi:10.1038/s41574-020-0353-9.
34. Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2013 Jun;169(3):477-92. doi:10.1111/bph.12159.
35. Singh AK, Gupta R, Ghosh A, Misra A. Diabetes in COVID-19: Prevalence, pathophysiology, prognosis and practical considerations. *Diabetes Metab Syndr.* 2020 Jul-Aug;14(4):303-310. doi:10.1016/j.dsx.2020.04.004.
36. Peric S, Stulnig TM. Diabetes and COVID-19: Disease-Management-People. *Wien Klin Wochenschr.* 2020 Jul;132(13-14):356-361. doi:10.1007/s00508-020-01672-3.
37. Pal R, Bhansali A. COVID-19, diabetes mellitus and ACE2: The conundrum. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020 Apr;162:108132. doi:10.1016/j.diabres.2020.108132.
38. Kohio HP, Adamson AL. Glycolytic control of vacuolar-type ATPase activity: a mechanism to regulate influenza viral infection. *Virology.* 2013 Sep;444(1-2):301-9. doi:10.1016/j.virol.2013.06.026.
39. Fadini GP, Morieri ML, Longato E, Avogaro A. Prevalence and impact of diabetes among people infected with SARS-CoV-2. *J Endocrinol Invest.* 2020 Jun;43(6):867-869. doi:10.1007/s40618-020-01236-2.
40. Li B, Yang J, Zhao F, Zhi L, Wang X, Liu L, et al. Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China. *Clin Res Cardiol.* 2020 May;109(5):531-538. doi:10.1007/s00392-020-01626-9.
41. Dunn EJ, Grant PJ. Type 2 Diabetes: An Atherothrombotic Syndrome. *Curr Mol Med.* 2005 May;5(3):323-32. doi:10.2174/1566524053766059.
42. Fernandez C, Rysä J, Almgren P, Nilsson J, Engström G, Orholm-Melander M, et al. Plasma levels of the proprotein convertase furin and incidence of diabetes and mortality. *Intern Med.* 2018 Oct; 284(4):377-387 doi:10.1111/joim.12783.
43. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ; HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020 Mar 28;395(10229):1033-1034 doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
44. Gao Y, Li T, Han M, Li X, Wu D, Xu Y, et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *J Med Virol.* 2020 Jul;92(7):791-796. doi:10.1002/jmv.25770.
45. Ashfaq UA, Khalid H. Mechanism of hepatitis C virus-induced diabetes mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2017;27(4):363-371. doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2017020437.
46. Yoon JW, Eun HM, Essani K, Roncari DA, Bryan LE. Possible mechanisms in the pathogenesis of virus-induced diabetes mellitus. *Clin Invest Med.* 1987 Sep;10(5):450-6.
47. Levet S, Charvet B, Bertin A, Deschaumes A, Perron H, Hober D. Human Endogenous Retroviruses and Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep.* 2019 Nov 21;19(12):141. doi:10.1007/s11892-019-1256-9.
48. Hussain A, Bhowmik B, do Vale Moreira NC. COVID-19 and diabetes: Knowledge in progress. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020 Apr; 162:108142. doi:10.1016/j.diabres.2020.108142.
49. Rubino F, Amiel SA, Zimmet P, Alberti G, Bornstein S, Eckel RH, et al. New-Onset Diabetes in Covid-19. *N Engl J Med.* 2020 Aug 20;383(8):789-790. doi:10.1056/nejmc2018688.
50. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care.* 2020 Jan;43(Suppl 1):S14-S31. doi:10.2337/dc20-S002.
51. Donath MY, Størling J, Maedler K, Mandrup-Poulsen T. Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl).* 2003 Aug;81(8):455-70 doi: 10.1007/s00109-003-0450-y.
52. Donath MY, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T. Targeting innate immune mediators in type 1 and type 2 diabetes. *Nat Rev Immunol.* 2019 Dec;19(12):734-746. doi:10.1038/s41577-019-0213-9.
53. Gupta R, Ghosh A, Singh AK, Misra A. Clinical considerations for patients with diabetes in times of COVID-19 epidemic. *Diabetes Metab Syndr.* 2020 May-Jun;14(3):211-212doi:10.1016/j.dsx.2020.03.002.

Correspondência

Mauren Isfer Anghebem

Universidade Federal do Paraná

Av. Prof. Lothario Meissner, 632 - Jardim Botânico

80210-170 - Curitiba-PR, Brasil

mauren.isfer@ufpr.br

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Rua Imaculada Conceição, 1.155 - Prado Velho

80215-901 - Curitiba-PR, Brasil

mauren.isfer@ufpr.br

Insuficiência renal aguda em pacientes com COVID-19

Acute kidney injury in patients with COVID-19

José Antonio Tesser Poloni¹

Viviane Schmitt Jahnke¹

Liane Nanci Rotta²

Resumo

Apesar de inicialmente terem surgido como agentes etiológicos de resfriados comuns, os coronavírus se tornaram uma ameaça global no século XXI, provocando síndromes respiratórias com alto poder de transmissão e contribuindo para quadros graves que podem levar à morte. Além dos coronavírus que emergiram no século XXI, quatro outros coronavírus humanos são mundialmente endêmicos e atualmente representam até 30% das infecções do trato respiratório superior em adultos. A pandemia atual de Síndrome Respiratória Aguda Grave causada por SARS-CoV-2, denominada COVID-19, vem aumentando sua casuística de forma importante, causando o colapso dos sistemas de saúde. Além dos danos ao sistema respiratório, a insuficiência renal aguda (IRA) é uma importante complicação da COVID-19, ocorrendo em 0,5%-7% dos casos e em 2,9%-23% dos pacientes em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Até o momento não se conhecem os mecanismos relacionados à etiologia da IRA associada à COVID-19. Nesta revisão são apresentadas algumas informações associadas à COVID-19 como histórico, manifestações clínicas e laboratoriais, à IRA (especialmente em pacientes internados em UTI) e enfatizando as alterações evidenciadas no exame de urina em pacientes com COVID-19.

Palavras-chave

COVID-19; SARS-CoV-2; insuficiência renal aguda; uroanálise

INTRODUÇÃO

SARS-CoV-2 e a COVID-19

Os coronavírus (CoV) são patógenos importantes para humanos, animais, pássaros, morcegos, camundongos e outros animais selvagens, podendo infectar o sistema respiratório, gastrointestinal, hepático e nervoso central desses animais. Essas infecções podem ser agudas ou persistentes, sendo transmitidas principalmente pelas vias respiratórias e fecal-oral.⁽¹⁾

Em dezembro de 2019, um coronavírus humano (HCoV) patogênico, denominado coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), foi identificado em Wuhan (China) como agente etiológico de uma pandemia global (COVID-19), causando o colapso dos sistemas de saúde em virtude da falta de leitos em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) e de exames diagnósticos rápidos e eficientes.⁽²⁾ Nesta época, um grupo de pacientes foi internado em hospitais chineses com diagnóstico inicial de pneumonia com etiologia desconhecida e essas infecções

foram consideradas de origem zoonótica, atribuídas a um mercado atacadista de frutos do mar e animais selvagens em Wuhan, cidade que possui cerca de 11 milhões de habitantes.⁽³⁾ O isolamento do vírus e a análise molecular mostraram que o patógeno era um novo CoV, o SARS-CoV-2.⁽⁴⁾

Na primeira fase, de dezembro de 2019 a meados de janeiro de 2020, 41 casos foram confirmados. A segunda fase começou em 13 de janeiro, marcada pela rápida disseminação do vírus nos hospitais (infecção hospitalar) e pela transmissão familiar por contato próximo, de modo que, em 23 de janeiro, 29 províncias da China e seis outros países já registravam 846 casos.^(4,5) Apesar de o decreto de isolamento social, 5 milhões de pessoas já haviam deixado Wuhan em virtude do término das comemorações do ano novo chinês.⁽⁴⁾ A terceira fase começou em 26 de janeiro, marcada pelo rápido aumento de casos agrupados, resultantes da transmissão comunitária. Em 30 de janeiro de 2020 atingiram-se 7.834 casos confirmados, incluindo 7.736 na China. Nesse surto, 170 pessoas perderam a vida, todas na China, havendo ainda 98 casos em 18 países fora da China, sendo oito de

¹Universidade do Vale do Rio dos Sinos. São Leopoldo-RS, Brasil.

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre-RS, Brasil.

Instituição: Universidade do Vale do Rio dos Sinos. São Leopoldo-RS, Brasil.

Recebido em 03/08/2020

Artigo aprovado em 17/08/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200017

transmissão de humano para humano em quatro países: Alemanha, Japão, Vietnã e Estados Unidos da América do Norte, com a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarando esta epidemia uma Emergência de Saúde Pública de Âmbito Internacional.⁽⁶⁾ A partir de então, a doença atingiu todos os continentes do mundo, sendo considerada uma pandemia pela OMS. Essa pandemia perdura até a presente data, provocando inúmeros casos e mortes em todos os continentes.⁽²⁾

No momento de redação deste artigo, o SARS-CoV-2 já infectou cerca 12.552.765 pessoas em 216 países diferentes, causando 561.617 mortes.⁽⁶⁾ O primeiro caso de infecção por SARS-CoV-2 no Brasil foi confirmado no dia 26 de fevereiro de 2020⁽⁷⁾ e, atualmente (julho/2020), o Brasil consta com um número de 1.839.850 casos confirmados e 71.469 óbitos.⁽²⁾ Declarada pandemia em 11 de março de 2020 pela OMS,⁽⁸⁾ em 20 de março de 2020 a COVID-19 passou a ser considerada doença de transmissão comunitária em todo o território brasileiro.⁽⁹⁾

O sequenciamento do genoma do agente etiológico da SARS (SARS-CoV) foi fundamental para permitir a inferência das relações evolutivas existentes entre diferentes isolados de pacientes por meio de análises filogenéticas.⁽¹⁰⁾ Uma combinação de informações genômicas e epidemiológicas permitiu às autoridades chinesas rastrear as variações genotípicas determinantes para disseminação viral.⁽¹¹⁾

Manifestações clínicas e laboratoriais da COVID-19

Os achados clínicos, laboratoriais e de imagem, bem como os fatores associados à evolução do quadro clínico, são fundamentais para compreender o curso da doença e auxiliar na escolha da conduta clínica mais adequada ao caso. Os sintomas da infecção por SARS-CoV-2 aparecem após um período de incubação de aproximadamente 5,2 dias.⁽⁵⁾ Em observações iniciais na China,^(5,12,13) os pacientes com COVID-19 apresentaram, como manifestações clínicas mais frequentes, febre (88,7%, IC 95% 84,5%-92,9%), tosse (57,6%, IC 95% 40,8%-74,4%) e dispneia (45,6%, IC 95% 10,9%-80,4%). A frequência da febre foi significativamente maior em adultos em comparação com crianças (92,8%, IC 95% 89,4%-96,2%, *versus* 43,9%, IC 95% 28,2%-59,6%).⁽¹⁴⁾

As anormalidades laboratoriais encontradas incluíram, predominantemente, hipoalbuminemia (75,8%, IC 95% 30,5%-100,0%), marcadores inflamatórios elevados como a proteína C reativa (58,3%, IC 95% 21,8%-94,7%), lactato desidrogenase – LDH (57,0%, IC 95% 38,0%-76,0%) e eritrossedimentação (41,8%, IC 95% 0,0%-92,8%) entre outros. Além disso, a linfopenia (43,1%, IC 95% 18,9%-67,3%) está presente de forma consistente em mais de 40% dos

pacientes.⁽¹⁴⁾ Dados do surto de 2002-2003 indicam que a SARS pode estar associada à linfopenia, leucopenia e trombocitopenia, níveis elevados de LDH, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e creatina quinase (CK),⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ mas também, em casos da COVID-19, com hiponatremia leve e hipocalcemia. A frequência de linfopenia sugere que o SARS-CoV-2 pode atuar nos linfócitos, especialmente nos linfócitos T, e, assim como o SARS-CoV, pode estar incluindo a depleção de células CD4 e CD8.⁽¹⁸⁾ As partículas virais se espalham pela mucosa respiratória, usando inicialmente o receptor ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2) nas células epiteliais brônquicas ciliadas e, em seguida, infectam outras células. Isso induz a uma "tempestade" de citocinas e gera uma série de respostas imunes que causam alterações nos leucócitos periféricos e células do sistema imune.^(19,20)

Aproximadamente 20% dos hospitalizados precisam ser internados na UTI para tratamento crítico. Ao contrário da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), com o seu curso clínico em duas etapas bem caracterizadas da doença, a COVID-19 ainda precisa de mais definições.⁽²¹⁾ A primeira semana da doença é semelhante, coincidindo com dados recentes da carga viral durante esse estágio. No entanto, estudos de caso controle e estudos de coorte são necessários para definir melhor a evolução clínica da doença. Um segundo estágio, como ocorre na SARS, também pode ser observado na COVID-19: comprometimento bilateral do trato respiratório inferior, em mais de 72% dos pacientes, tosse seca e dispneia,^(14,21) com imagens radiológicas do tórax de opacidade em "vidro fosco" ocorrendo em 2/3 dos pacientes.^(15,16)

Dados sugerem que a idade avançada e as comorbidades desempenham um papel vital na influência de doenças graves e resultados clínicos negativos. Dados clínicos são úteis para a identificação dos fatores de risco para doenças graves e morte, bem como para auxiliar o gerenciamento de pacientes nos grupos de risco. Com relação às complicações e morte, 1/3 dos pacientes apresentou SARS, mas, também, insuficiência renal aguda (IRA), lesão cardíaca aguda e choque, eventualmente seguidos por falência de múltiplos órgãos. A IRA representa uma complicação importante, à qual estão associados altos índices de mortalidade. Portanto, a identificação precoce e o tratamento oportuno de casos críticos são de importância crucial.⁽¹⁸⁾

Na revisão a seguir é destacada a insuficiência renal aguda na COVID-19.

Insuficiência renal aguda

Insuficiência renal aguda (IRA) é uma condição caracterizada por um declínio na taxa de filtração glomerular (TFG) durante um período temporal curto (horas a dias).

A apresentação geralmente consiste em um aumento da concentração de creatinina sérica e, em alguns casos, oligúria ou anúria.^(22,23) Utilizando a definição da KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*), a IRA pode se manifestar como alterações apenas na creatinina sérica (12% dos pacientes), apenas na produção de urina (38%) ou em ambas (50%).⁽²⁴⁾ A excreção de creatinina diminui durante uma diminuição sustentada da taxa de filtração glomerular (TFG), que faz com que a concentração sérica de creatinina aumente ao longo do tempo, até que a excreção de creatinina novamente seja igual à produção. Da mesma forma, um período sustentado de oligúria pode ser causado por um mecanismo intacto de concentração urinária que funciona com capacidade aumentada ou por um sistema que falhou devido à lesão, no qual a TFG é tão baixa que a produção de urina não pode ser mantida. Sob esse prisma, a oligúria mais grave pode ser vista como um marcador adicional da gravidade da IRA através da indicação de um declínio substancial na TFG (que pode ser difícil de observar pelas mudanças precoces na creatinina sérica), no cenário dinâmico da doença aguda.⁽²⁵⁾

As taxas e causas de IRA são altamente variáveis em diferentes países, com referência específica aos recursos locais e sistemas de saúde. A incidência de IRA varia de acordo com a população estudada. Nos EUA é responsável por 1% das internações, enquanto que a IRA adquirida no hospital tem uma incidência de 5% a 7%.⁽²⁶⁾

As causas de IRA são frequentemente divididas em pré-renais, que podem ser resultado de hipoperfusão ou hipovolemia, incluindo diminuição da ingestão, vômito, diarreia, perda de sangue, insuficiência cardíaca, síndrome hepatorenal, sepse e, menos comumente, estenose e trombose na artéria renal,^(26,27) e pós-renais, que são obstrutivas, como nefrolitíase, malignidade e hiperplasia prostática benigna. A causa mais comum da IRA é a necrose tubular aguda.⁽²⁶⁾

A IRA pode levar a complicações causadas por uremia (encefalopatia, neuropatia, pericardite), sobrecarga de volume (dispneia, edema pulmonar) e distúrbios eletrolíticos (especialmente hipercalemia),⁽²⁰⁾ as quais estão associadas ao aumento da mortalidade em pacientes que desenvolvem IRA. Além disso, alguns pacientes nunca recuperam completamente sua linha de base da função renal e podem precisar de diálise em longo prazo.⁽²⁵⁾

Como a IRA geralmente surge como consequência de outras síndromes (insuficiência cardíaca, insuficiência hepática e sepse) que causam morbidade e mortalidade substanciais, muitas vezes é ignorado o significado da IRA como marcador da gravidade da doença. O diagnóstico e o tratamento precoce e rápido da IRA são parte importante do manejo geral do paciente. Adicionalmente, o manejo do distúrbio original geralmente ajuda a resolver a IRA.^(26,28-31)

COVID-19 e danos renais

Embora o dano alveolar difuso e a insuficiência respiratória aguda sejam as principais características da COVID-19, há envolvimento de outros órgãos, incluindo os rins.⁽³²⁾ A IRA é uma importante complicação da COVID-19 e os potenciais mecanismos de envolvimento renal nesses pacientes podem ser divididos didaticamente em três aspectos: (i) dano estimulado por citocinas, (ii) *crosstalk* de órgãos e (iii) efeitos sistêmicos. Esses mecanismos estão profundamente interconectados e têm implicações importantes para a terapia.^(13,20,33,34)

Até o momento não está esclarecido se a IRA na COVID-19 é causada por efeitos citopáticos induzidos pelo SARS-CoV-2 ou por uma resposta inflamatória sistêmica decorrente de uma "tempestade" de citocinas.⁽¹³⁾ Em pacientes com tempestade de citocinas, a IRA pode ocorrer como resultado de inflamação intra-renal, aumento da permeabilidade vascular, depleção de volume e cardiomiopatia, que podem levar à síndrome cardiorrenal tipo 1. A síndrome de liberação de citocinas inclui lesão endotelial sistêmica, que se manifesta clinicamente como derrames pleurais, edema, hipertensão abdominal, depleção de líquido intravascular e hipotensão. Achados recentes confirmaram a estreita relação entre dano alveolar e tubular – o eixo pulmão-rim na síndrome respiratória aguda.⁽³⁵⁾

Foi demonstrada a presença do novo coronavírus tanto em podócitos como em células dos túbulos proximais renais.⁽³³⁾ O vírus pode acessar a corrente sanguínea a partir da circulação pulmonar, acumular-se nos rins e causar danos às células renais.⁽³⁶⁾ Estudos relataram que o SARS-CoV-2 explora a mesma enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2, uma carboxipeptidase) ligada à membrana das células.^(37,38) Nos rins, a ACE2 é altamente expressa na borda das células tubulares proximais e, em menor grau, nos podócitos, mas não nas células endoteliais e mesangiais glomerulares,⁽³⁹⁾ sugerindo, portanto, que esses órgãos possam estar em risco de dano.

Notavelmente, podócitos são particularmente vulneráveis a ataques bacterianos e virais, e lesão nos podócitos induz facilmente à proteinúria intensa.^(8,10) Dados recentes demonstraram que 43,9% dos pacientes infectados com o SARS-CoV-2, especialmente aqueles com IRA, têm proteinúria.^(8,11) Além disso, o SARS-CoV-2 foi detectado nas amostras de urina de pacientes com COVID-19 severa.^(8,12) Ainda não está claramente esclarecido se a entrada viral no tecido renal desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da IRA, porém a autópsia de 26 pacientes que morreram com COVID-19, sendo nove deles portadores de IRA, revelou evidência histopatológica de lesão tubular aguda em todos os casos.⁽⁴⁰⁾

Hirsch et al.⁽⁴¹⁾ sugerem fortemente que a IRA grave é uma condição que ocorre em pacientes com COVID-19 que

também têm insuficiência respiratória, e que 36,6% desenvolveram IRA durante a internação. A estreita relação temporal entre IRA e a ocorrência de insuficiência respiratória é um pouco sugestiva de necrose tubular aguda isquêmica, que geralmente ocorre em concordância com o colapso sistêmico. No entanto, outras etiologias devem continuar a ser consideradas.^(32,42)

De acordo com a literatura, o tempo decorrido entre a detecção da SARS-CoV-2 no sangue e a ocorrência de IRA foi de aproximadamente sete dias.⁽³³⁾ Os efeitos citopáticos do SARS-CoV-2 nos podócitos e nas células dos túbulos proximais podem causar IRA nos pacientes com COVID-19, especialmente em pacientes com presença do SARS-CoV-2 nas amostras de sangue. É necessário estar atento e monitorar precocemente a função renal e também o manuseio das amostras de urina dos pacientes com COVID-19 e que estejam com IRA para prevenir infecções acidentais.⁽³³⁾

Insuficiência renal aguda em pacientes com COVID-19 internados em UTI

Entre 8% e 15% (dependendo da configuração geográfica e das características individuais) de todos os casos positivos para SARS-CoV-2 podem ser classificados como graves ou que necessitam de internação em unidade de terapia intensiva (UTI). Em pacientes com COVID-19, 7,58% (95% IC 3,30%-13,54%) desenvolveram IRA, com um índice de mortalidade de 93,27% (95% IC 81,46%-100%). Em 5,74% (95% ICI 2,88%-9,44%) de pacientes com COVID-19 foi detectado o RNA viral na amostra de urina.⁽⁴³⁾

Embora a taxa de mortalidade da COVID-19 pareça menor do que a da SARS ou MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*), o número de pacientes que necessitam de cuidados críticos urgentes é notavelmente maior do que aquele observado nos dois surtos virais anteriores e pode promover o colapso dos cuidados de saúde locais.⁽⁴⁴⁾

A IRA é uma complicação importante em pacientes hospitalizados (10% a 15% de todas as internações) e apresenta morbidade significativa em pacientes críticos, tanto em UTI médica quanto cirúrgica.⁽⁴⁵⁾ No entanto, os dados permanecem escassos sobre características específicas de IRA associada à COVID-19. Existem várias causas de IRA no ambiente de cuidados intensivos, sendo que necrose tubular aguda permanece a mais comum. O processo geralmente é multifatorial, incluindo sepse, drogas nefrotóxicas, agentes de contraste e causas pós-cirúrgicas, dentre outras.^(46,47) Aproximadamente 5% a 20% dos pacientes na UTI vão desenvolver IRA por alguma das causas descritas acima, dos quais aproximadamente 6% exigirão alguma forma de terapia de substituição renal

durante a internação na UTI.^(25,48,49) Esses pacientes costumam ter um curso hospitalar prolongado, com maior tempo de permanência em UTI, podendo exigir diálise após a alta. A incidência de IRA relacionada à UTI aumentou nas últimas décadas e isso provavelmente é devido à crescente incidência de sepse relacionada às internações hospitalares.⁽⁴⁶⁾

Um estudo observacional prospectivo multicêntrico investigou todos os pacientes com COVID-19 recebidos em 19 UTI de 16 hospitais em Wuhan, China, durante 24 horas, em fevereiro de 2020. Foram incluídos 226 pacientes. Entre todos os pacientes, 155 (68,6%) tinham pelo menos uma doença coexistente e o escore sequencial de avaliação de insuficiência orgânica foi de valor 4. Foram encontrados danos na função dos órgãos na maioria dos pacientes: síndrome respiratória aguda em 161 (71,2%), choque séptico em 34 (15,0%), doença renal aguda em 57 (25,2%) e lesão cardíaca em 61 (27,0%).⁽⁴⁸⁾

Achados da uroanálise nos pacientes com IRA secundária à COVID-19

Está estabelecido que o envolvimento do trato urinário é comum em pacientes com COVID-19, e que a deterioração progressiva da função renal deve ser considerada um fator prognóstico desfavorável.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ A IRA foi observada em pacientes com COVID-19, no entanto, dados permanecem escassos sobre características específicas de IRA associada à COVID-19.

Neste contexto, a uroanálise se faz presente como uma área com informações úteis especialmente para a identificação de IRA, bem como na identificação de quais locais dos rins estão sendo agredidos e gerando a IRA. Há apenas três estudos disponíveis até o momento, com informações sobre os achados do exame de urina (tira reativa e sedimento urinário) em pacientes com COVID-19, no entanto, os resultados já demonstram um panorama de informações interessantes.^(49,52,53)

No estudo de Liu et al.,⁽⁵²⁾ as taxas de resultados positivos de hemoglobina e proteínas urinárias em pacientes com COVID-19 foram superiores às dos controles saudáveis, e os valores de densidade e pH também foram diferentes entre os pacientes com COVID-19 e controles saudáveis. No entanto, a taxa de resultados positivos para esterase leucocitária urinária não foi significativamente diferente. Os resultados indicam que as diferenças na hemoglobina, proteínas, densidade e pH são causadas pela infecção por SARS-CoV-2, e não por infecção bacteriana. Devido ao grande número de pacientes sintomáticos com COVID-19, os pacientes com diagnóstico, mas assintomáticos, raramente são tratados em hospitais e, em vez disso, são designados principalmente para pontos de isolamento temporário para tratamento. Portanto, é difícil obterem-se

informações detalhadas sobre a função renal dos pacientes assintomáticos. De qualquer forma, os resultados bioquímicos da urina ainda se mostraram interessantes, e glicosúria e proteinúria estavam associados à gravidade do COVID-19. Comparados com pacientes com COVID-19 moderada, as taxas de positividade de glicosúria e proteinúria aumentaram significativamente nos grupos grave e crítico. Entretanto, hemoglobina, esterase leucocitária, hemácias e leucócitos urinários não foram diferentes entre os grupos moderado, severo e crítico, implicando que a proteinúria elevada não foi causada por infecção bacteriana no sistema urinário, mas por infecção por SARS-CoV-2.^(52,54,55)

Além disso, a cetonúria positiva não foi significativamente diferente entre as diferentes gravidades da COVID-19, e a hiperglicemia temporária não causou a tendência do paciente para cetoacidose, que indiretamente indicou que o choque no paciente era principalmente devido à função pulmonar prejudicada. Nessas circunstâncias, os parâmetros bioquímicos da urina são úteis também na avaliação das alterações dinâmicas em pacientes com COVID-19.⁽⁵²⁾

No estudo de Bonetti et al.,⁽⁴⁹⁾ proteinúria e hematúria estavam presentes na maioria dos pacientes já na admissão hospitalar. A análise do sedimento urinário revelou a presença de eritrócitos e cilindros em cerca de 50% dos pacientes. A comparação do exame dos pacientes que morreram com aqueles que receberam alta demonstrou que a maioria dos parâmetros do exame de urina não foi diferente, embora alguns aspectos interessantes possam ser destacados. Uma característica paradigmática foi a presença mais frequente de cilindros granulados e células epiteliais tubulares renais na urina dos pacientes que morreram. O comprometimento renal também foi encontrado com maior frequência nos pacientes que morreram, observado pela maior taxa de ureia e creatinina anormais na admissão destes pacientes (entre 75% e 80%) em comparação com aqueles que puderam receber alta (entre 20% e 24%).⁽⁴⁹⁾

Tomados em conjunto, esses achados da uroanálise em pacientes italianos com COVID-19 parecem estar de acordo com dados publicados anteriormente em uma coorte chinesa confirmando a presença frequente de proteinúria e hematúria nessa doença infecciosa.^(49,52,56) No entanto, os valores desses parâmetros urinários foram consistentemente mais altos do que em estudos anteriores, sugerindo que no estudo italiano a população com COVID-19 talvez estivesse nas piores condições clínicas no momento da admissão hospitalar, como refletido na mortalidade consideravelmente alta naquele ambiente, isto é, 26%. Outro aspecto importante é que o envolvimento renal pode ser um preditor significativo de progressão desfavorável da doença, confirmando assim as premissas anteriores^(49,50) e,

finalmente, reafirmando a importância dos exames laboratoriais na estratificação de risco do COVID-19.^(49,57) O exame de urina deve ser realizado regularmente em todos os pacientes com COVID-19, pelo que pode fornecer de informações importantes para o manejo clínico e a previsão de riscos.

No estudo de Hernandez-Arroyo et al.,⁽⁵³⁾ a maioria dos achados no sedimento urinário foi consistente com dano tubular agudo. Como a instabilidade hemodinâmica relacionada ao choque e à depleção prolongada do volume devido a mal-estar e ingestão oral reduzida são componentes comuns do curso clínico da COVID-19, não surpreende que as características de dano tubular agudo sejam dominantes.

Uma abundância razoável de cilindros granulados grosseiros foi observada em 75% dos casos, enquanto que metade das amostras revelou presença de cilindros céreos, e uma fração menor continha cilindros epiteliais. Todos os tipos de cilindros associados a dano tubular agudo foram identificados nesta coorte americana. Em muitos casos, as características observadas nos sedimentos urinários e compatíveis com danos tubulares agudos estavam alinhadas com um evento clínico suspeito de dano tubular agudo isquêmico ou tóxico ou foram corroboradas pelo dano tubular agudo comprovado por biópsia. Este último foi encontrado em todos os pacientes que foram submetidos à biópsia renal devido à proteinúria de faixa nefrótica e foram encontrados com glomerulopatia em colapso junto com dano tubular agudo. Curiosamente, em todos os casos em que nenhuma causa clara de IRA pôde ser identificada por motivos clínicos, foram encontradas características de dano tubular agudo, sugerindo que uma forma de dano tubular agudo também pode ser a etiologia da IRA mesmo nos casos marcados como de IRA inexplicável. As observações do estudo estavam de acordo com outro estudo de achados *post-mortem* em rins de pacientes falecidos com COVID-19, que revelaram o dano tubular agudo como característica histopatológica dominante em 100% dos casos.^(51,57) Além disso, o termo "nefrite" tem sido proposto para descrever casos de IRA na COVID-19 que apresentavam essas características urinárias.^(53,58) Na perspectiva do sedimento urinário, os achados que validariam uma suspeita de nefrite intersticial ou glomerular incluem a presença de cilindros leucocitários, cilindros eritrocitários ou acantócitos, que não foram observados nas amostras analisadas no estudo de Hernandez-Arroyo et al. Por fim, no sedimento urinário não foram encontradas evidências definitivas para apoiar a suposição de que existe uma forma de nefrite que contribui como causa de IRA em pacientes com COVID-19.⁽⁵³⁾

Sumarizando as informações dos três estudos, proteinúria e achados de dano tubular, cilindros granulados, cilindros epiteliais e células epiteliais tubulares

renais parecem ser as informações presentes mais frequentemente nos pacientes com COVID-19 e se relacionam com a IRA. Isto demonstra o efetivo papel do exame de urina na detecção da IRA nos pacientes com COVID-19, contribuindo para o diagnóstico precoce desta importante condição associada com alta taxa de mortalidade da doença.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A COVID-19 está associada à infecção pelo SARS-CoV-2 e representa uma condição clínica emergencial que acomete milhões de pessoas no mundo, atualmente. Pacientes portadores apresentam alta mortalidade especialmente quando apresentam IRA, situação que se destaca em pacientes internados em UTI. Neste contexto, a uroanálise aparece como um exame que pode ser útil no diagnóstico e monitoramento da IRA associada à COVID-19. O padrão clínico-laboratorial dos achados físico-químicos e sedimentoscópicos evidencia elementos e características associados a dano tubular. O laboratório clínico tem papel fundamental no diagnóstico da IRA nos pacientes com COVID-19, o analista clínico deve estar atento para conseguir extrair as informações que as amostras têm a oferecer.

Abstract

Although they initially emerged as etiologic agents of common colds, coronaviruses became a global threat in the 21st century, causing respiratory syndromes with high transmission power and contributing to serious conditions that can lead to death. In addition to the coronaviruses that emerged in the 21st century, four other human coronaviruses are globally endemic and currently account for up to 30% of upper respiratory tract infections in adults. The current pandemic of Severe Acute Respiratory Syndrome caused by SARS-CoV-2, called COVID-19, has been increasing its casuistry significantly, and causing the collapse of health systems. In addition to damage to the respiratory system, acute kidney injury (AKI) is an important complication of COVID-19, occurring in 0.5-7% of cases and in 2.9-23% of patients in the Intensive Care Unit (ICU). So far, the mechanisms related to the etiology of AKI associated with COVID-19 are not known. In this review, some information associated with COVID-19 is presented, such as history, clinical and laboratory manifestations, AKI (especially in ICU patients), and emphasizing the changes evidenced in the urine test in patients with COVID-19.

Keywords

COVID-19; SARS-CoV-2; acute kidney injury; urinalysis

REFERÊNCIAS

- Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006; 66:193-292. doi:10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
- Johns Hopkins University. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center, 2020. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>, último acesso em 14/07/2020.
- Lu H, Stratton CW, Tang Y-W. Outbreak of Pneumonia of Unknown Etiology in Wuhan China: the Mystery and the Miracle. *J Med Virol.* 2020 Apr;92(4):401-2. doi:10.1002/jmv.25678.
- Sun J, He W-T, Wang L, Lai A, Ji X, Zhai X, et al. COVID-19: epidemiology, evolution, and cross-disciplinary perspectives. *Trends Mol Med.* 2020 May;26(5):483-95. doi:10.1016/j.molmed.2020.02.008.
- Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med.* 2020 Mar;382(13):1199-207. doi:10.1056/NEJMoa2001316.
- Organização Mundial da Saúde. WHO Director-General's statement on IHR Emergency Committee on Novel Coronavirus (2019-nCoV), 2020a. Disponível em: <[https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ih-er-emergency-committee-on-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-ih-er-emergency-committee-on-novel-coronavirus-(2019-ncov))>, último acesso em 14/07/2020.
- Brasil, Ministério da Saúde. Coronavírus COVID-19 - Brasil confirma primeiro caso da doença. 6 Jul 2020. [<https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46435-brasil-confirma-primeiro-caso-de-novo-coronavirus>].
- WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
- Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº 454, de 20 de março de 2020 - Declara, em todo o território nacional, o estado de transmissão comunitária do coronavírus (covid-19). *Diário Oficial da União* 2020;55-F:1. [<http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-454-de-20-de-marco-de-2020-249091587>].
- Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science.* 2003;300(5624):1394-9. doi:10.1126/science.1085952.
- Ruan Y, Wei CH, Ee AL, Vega VB, Thoreau H, Su STY, et al. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *The Lancet.* 2003;361(9371):1779-85. doi:10.1016/s0140-6736(03)13414-9. Erratum in *Lancet.* 2003 May 24;361(9371):1832.
- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):507-13. doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. [published correction appears in *Lancet.* 2020 Jan 30]. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis.* Mar-Apr 2020; 34:101623. doi:10.1016/j.tmaid.2020.101623.
- Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020 Mar;579(7798):270-73. doi:10.1038/s41586-020-2012-7.
- Zhao W, Zhong Z, Xie X, Yu Q, Liu J. Relation between chest CT findings and clinical conditions of coronavirus disease (COVID-19) pneumonia: a multicenter study. *AJR Am J Roentgenol* 2020 May;214(5):1072-7. doi:10.2214/AJR.20.22976.
- Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. [published correction appears in *Lancet Respir Med.* 2020 Feb 25;]. *Lancet Respir Med.* 2020;8(4):420-422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
- Chen N, HuB, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020 Feb 15;395(10223):507-13. doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7.

19. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. [published correction appears in *Lancet*. 2020 Jan 30;]. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
20. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhanget J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020 Feb 7;323(11):1061-9. [published online ahead of print, 2020 Feb 7]. *JAMA*. 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585
21. Srikantiah P, Charles ND, Reagan S, Clark TA, Pletz MDR, Patel PR, et al. SARS clinical features, United States, 2003. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jan;11(1):135-8. doi:10.3201/eid1101.040585.
22. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet* [Internet]. 2012;380(9843):756-66. doi:10.1016/S0140-6736(11)61454-2.
23. Hoste EAJ, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: A cohort analysis. *Crit Care*. 2006;10(3):1-10.
24. Kaddourah A, Basu RK, Bagshaw SM, Goldstein SL; AWARE Investigators. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill children and young adults. *N Engl J Med*. 2017;376(1):11-20. doi:10.1056/NEJMoa1611391.
25. Kellum JA, Prowle JR. Paradigms of acute kidney injury in the intensive care setting. *Nat Rev Nephrol*. 2018 Apr;14(4):217-30. doi:10.1038/nrneph.2017.184.
26. Remer EM, Papanicolaou N, Casalino DD, Bishoff JT, Blaufox MD, Coursey CA, et al. ACR appropriateness criteria(®) on renal failure. *Am J Med* [Internet]. 2014 Nov;127(11):1041-1048.e1. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.05.014.
27. Kanagasundaram NS. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Ann Clin Biochem*. 2015 Mar;52(Pt 2):193-205. doi: 10.1177/0004563214556820.
28. Bagshaw SM, George C, Bellomo R; ANZICS Database Management Committee. Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Crit Care*. 2008;12(2):R47. doi:10.1186/cc6863. Epub 2008 Apr 10.
29. Bagshaw SM, Bellomo R, Devarajan P, Johnson C, Karvellas CJ, Kutsogiannis DJ, et al. Review article: Acute kidney injury in critical illness. *Can J Anaesth*. 2010;57(11):985-98. doi:10.1007/s12630-010-9375-4.
30. Kellum JA, Bellomo R, Ronco C. Kidney attack. *JAMA*. 2012;307(21):2265-6. doi:10.1001/jama.2012.4315.
31. Bedford M, Stevens PE, Wheeler TW, Farmer CK. What is the real impact of acute kidney injury? *BMC Nephrol*. 2014;15:95. Published 2014 Jun 21. doi:10.1186/1471-2369-15-95.
32. Hirsch JS, Ng JH, Ross DW, Sharma P, Shah HH, Barnett RL, et al. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. In: Intergovernmental Panel on Climate Change, editor. *Kidney International* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2020. p. 209-18. Available from: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book_part.
33. Pan X-W, Xu D, Zhang H, Zhou W, Wang L-H, Cui X-G. Identification of a potential mechanism of acute kidney injury during the COVID-19 outbreak: a study based on single-cell transcriptome analysis. *Intensive Care Med*. 2020 Jun;46(6):1114-1116. doi:10.1007/s00134-020-06026-1.
34. Ronco C, Reis T. Kidney involvement in COVID-19 and rationale for extracorporeal therapies. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(6):308-310. doi:10.1038/s41581-020-0284-7.
35. Panitchote A, Mehkri O, Hastings A, Hanane T, Demirjian S, Torbic H, et al. Factors associated with acute kidney injury in acute respiratory distress syndrome. [published correction appears in *Ann Intensive Care*. 2019 Jul 23;9(1):84]. *Ann Intensive Care*. 2019;9(1):74. Published 2019 Jul 1. doi:10.1186/s13613-019-0552-5.
36. Brienza N, Puntillo F, Romagnoli S, Tritapepe L. Acute kidney injury in coronavirus disease 2019 infected patients: a meta-analytic study. *Blood Purif*. 2020 Jul 2;1-7. doi: 10.1159/000509274. Online ahead of print.
37. Hoffmann M, Kleine-weber H, Schroeder S, Mu MA, Drosten C, Po S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
38. Perico L, Benigni A, Remuzzi G. Should COVID-19 concern nephrologists? why and to what extent? the emerging impasse of angiotensin blockade. *Nephron*. 2020;144(5):213-21. doi:10.1159/000507305.
39. Ye M, Wysocki J, William J, Jose M, Cokic I, Battle D. Converting Enzyme 2 and Angiotensin-Converting Enzyme?: Implications for Albuminuria in Diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2006; Nov;17(11):3067-75. doi: 10.1681/ASN.2006050423
40. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int Kidney Int*. 2020 Jul;98(1):219-27. doi:10.1016/j.kint.2020.04.003.
41. Hirsch JS, Ng JH, Ross DW, Sharma R, Shah HH, Barnett RL, et al; Northwell COVID-19 Research Consortium; Northwell Nephrology COVID-19 Research Consortium. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int*. 2020 Jul; 98(1):209-18.
42. Mohamed MM, Lukitsch I, Torres-Ortiz AE, Walker JB, Varghese V, Hernandez-Arroyo CF, et al. Acute kidney injury associated with coronavirus disease 2019 in urban New Orleans. *Kidney360* July. 2020;1(7) 614-622; DOI: <https://doi.org/10.34067/KID.0002652020>. Available from: <http://kidney360.asnjournals.org/lookup/doi/10.34067/KID.0002652020>.
43. Chan V W-S, Chiu P K-F, Yee C-H, Yuan Y, Ng C-F, Teoh J Y-C. A systematic review on COVID-19: urological manifestations, viral RNA detection and special considerations in urological conditions. *Urol*. 2020 May 27;1-12. doi:10.1007/s00345-020-03246-4.
44. Lippi G, Plebani M. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(7):1063-9. doi: 10.1515/cclm-2020-0240.
45. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *Lancet*. 2019;394(10212):1949-1964. doi:10.1016/S0140-6736(19)32563-2.
46. Pakula AM, Skinner AS. Acute Kidney Injury in the Critically Ill Patient: A Current Review of the Literature. *J Intensive Care Med* 2016 Jun;31(5):319-24. doi:10.1177/0885066615575699.
47. Costa JAC, Neto MM, Neto OMV. IRA na Terapia Intensiva. *Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: Medicina Intensiva II. Tópicos Seleccionados 1998*;31:532-51.
49. Bonetti G, Manelli F, Bettinardi A, Borrelli G, Fiordalisi G, et al. Urinalysis parameters for predicting severity in coronavirus disease 2019 (COVID-19) [published online ahead of print, 2020 Jun 2]. *Clin Chem Lab Med*. 2020;/j/cclm.ahead-of-print/cclm-2020-0576/cclm-2020-0576.xml. doi:10.1515/cclm-2020-0576.
50. Henry BM, Lippi G. Chronic kidney disease is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. *Int Urol Nephrol* 2020. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11255-020-02451-9>.
51. Mohamed MMB, Lukitsch I, Torres-Ortiz AE, Walker JB, Varghese V, Hernandez-Arroyo CF et al. AKI with COVID-19 in NOLA *Kidney360* May 2020, 10.34067/KID.0002652020; DOI: 10.34067/KID.0002652020
52. Liu R, Ma Q, Han H, Su H, Liu F, Wu K, et al. The value of urine biochemical parameters in the prediction of severity of coronavirus disease 2019. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 25;58(7):1121-24. doi: 10.1515/cclm-2020-0220.
53. Hernandez-Arroyo CF, Varghese V, Mohamed MMB, Velez JCQ. COVID-19, AKI and Urine Sediment. *Kidney360* Jun 2020; doi: 10.34067/KID.0003352020.

54. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020 Feb; doi: 10.1001/jama.2020.2648.
55. Tetro JA. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? *Microbes Infect*. 2020;22(2):72-73. doi:10.1016/j.micinf. 2020.02.006.
56. Cheng Y, Luo R, Wang K, Zhang M, Wang Z, Dong L, et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int*. 2020 May;97(5):829-38. doi:10.1016/j.kint.2020.03.005
57. Henry BM, de Oliveira MH, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 25;58(7):1021-28. doi:10.1515/cclm-2020-0369
58. Su H, Yang M, Wan C, Yi LX, Tang F, Zhu HY, et al. Renal histopathological Analysis of 26 Postmortem Findings of Patients with COVID-19 in China. *Kidney Int*. 2020 Jul;98(1):219-27. doi:10.1016/j.kint.2020.04.003

Correspondência

José Antonio T. Poloni

*Escola de Saúde - Universidade do Vale do Rio dos Sinos
Av. Unisinos, 950, Bairro Cristo Rei
93022-750 - São Leopoldo-RS, Brasil*

Presença de RNA do SARS-CoV-2 em fezes de pacientes com COVID-19

Presence of SARS-CoV-2 RNA in faeces of COVID-19 patients

Cleonice Maria Michelon¹
Alexandre Piccinini²

Resumo

A COVID-19, doença causada pelo novo Coronavírus, alastrou-se rapidamente por todos os continentes promovendo uma pandemia. Estudos relacionados à fisiopatologia da COVID-19 demonstraram que o vírus SARS-CoV-2 invade células da mucosa intestinal, sendo eliminado nas fezes, alertando para possibilidade da transmissão da doença por via fecal-oral. A presença do vírus nas fezes aventou também a expectativa de utilizar essa amostra biológica para fins diagnósticos. Nesta revisão, resumimos os estudos recentes relacionados à investigação da presença do RNA do SARS-CoV-2 nas fezes de pacientes com COVID-19.

Palavras-chave

Infecções por Coronavírus; RNA; fezes; SARS-CoV-2; COVID-19

INTRODUÇÃO

Os números relacionados com a pandemia pelo novo Coronavírus (nCoV ou SARS-CoV-2) continuam crescendo. Segundo dados da Universidade Johns Hopkins, o número de casos de COVID-19 no mundo já ultrapassa os 12 milhões.⁽¹⁾ Desde o surgimento dos primeiros casos na China, pesquisadores de diferentes países se esforçam para compreensão da fisiopatologia da doença e na busca de métodos diagnósticos sensíveis e rápidos, intervenções terapêuticas e métodos preventivos eficazes.

A doença causada pelo SARS-CoV-2 se manifesta classicamente através de febre, tosse e dispneia ao esforço. Contudo, sintomas gastrintestinais como náuseas, vômito, diarreia e desconforto abdominal têm sido identificados em pacientes com COVID-19.⁽²⁻⁴⁾ Segundo revisão realizada por Tian et al., o sintoma gastrintestinal mais comum em adultos e crianças é a diarreia, relatado antes ou após diagnóstico da COVID-19.⁽⁵⁾

Estudos prévios evidenciaram o tropismo do SARS-CoV pelo trato gastrintestinal, verificado pela detecção do vírus em amostras de biópsia intestinal e fezes.⁽⁶⁾ O SARS-CoV-2 apresenta uma glicoproteína de superfície (proteína S) responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira, permitindo sua entrada.⁽⁷⁾ A fisiopatologia da COVID-19 não está completamente esclarecida, entretanto está confirmado que o vírus invade as células humanas através da liga-

ção da proteína S ao receptor da enzima conversora de angiotensina-2 (ECA2).⁽⁸⁾ Avaliando-se os níveis de expressão de ECA2, os órgãos considerados mais vulneráveis à infecção pelo SARS-CoV-2 incluem pulmão, coração, esôfago, rins, bexiga e intestino,⁽⁷⁾ sugerindo que outras vias de transmissão, além da respiratória, podem ser possíveis.^(5,7)

A presença do RNA viral nas fezes alerta para a possibilidade de transmissão do SARS-CoV-2 pela via fecal-oral e avanta também a expectativa de se utilizar essa amostra biológica para fins diagnósticos. Esta possibilidade se baseia no fato de pesquisadores terem identificado que a positividade em amostras de fezes pode preceder a detecção em amostras respiratórias⁽⁹⁾ e manter-se positiva após decaimento dos sintomas.^(10,11) Esta revisão buscou rastrear as publicações mais recentes em que houve investigação da presença do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de fezes, com o objetivo de identificar a média de positividade e verificar a viabilidade dessa amostra biológica para diagnóstico da COVID-19.

MATERIAL E MÉTODOS

Pesquisa na literatura

Os dados foram coletados por meio de busca de artigos publicados no site da PubMed pela combinação dos

¹Doutora, Docente do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis-SC, Brasil.

²Mestre. Prefeitura Municipal de Florianópolis - PMF. Florianópolis-SC, Brasil.

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Florianópolis -SC, Brasil.

Recebido em 28/07/2020
Artigo aprovado em 12/08/2020
DOI: 10.21877/2448-3877.20200018

termos "COVID-19", "SARS-CoV-2" e "fezes" ou "stool". Após a busca inicial foram excluídas as duplicidades e também os estudos que não atenderam aos critérios de inclusão.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos artigos publicados a partir do mês de maio de 2020. Devido à baixa familiaridade com outros idiomas, foram incluídos somente artigos em Inglês. Artigos de pacientes diagnosticados com COVID-19 cujas amostras de fezes tenham sido testadas para presença do vírus SAR-CoV-2 foram incluídos. Artigos de revisão, relatos de casos e estudos com animais ou amostras ambientais foram excluídos.

Extração de dados

Os artigos selecionados foram revisados e os dados extraídos foram: local da investigação; número, sexo e faixa etária dos participantes; número de pacientes testados e número com amostra de fezes positiva para RNA do SARS-CoV-2; pacientes com amostra de fezes positiva e amostra de nasofaringe negativa para RNA do SARS-CoV-2; persistência da positividade na amostra de fezes após *swab* de nasofaringe negativo.

RESULTADOS

A pesquisa na base PubMed resultou em 515 títulos. Retiradas as duplicidades restaram 202 publicações. Aplicando-se os critérios de exclusão, 12 artigos foram elegíveis (Quadro 1).

Os estudos elencados foram realizados em quatro países diferentes, sendo a maioria na China e tiveram a participação de 3.189 indivíduos. Do total de participantes, foram testados nos diferentes protocolos de estudo amostras de fezes de 369 indivíduos, incluindo adultos e crianças de ambos os sexos. As amostras de fezes avaliadas foram coletadas em diferentes fases e graus de severidade da doença, em populações heterogêneas, incluindo indivíduos com fatores de risco e comorbidades, que apresentavam ou não sintomas gastrintestinais. Essas diferenças na maioria dos estudos não estavam especificadas nos resultados, dificultando a extração de dados estratificados.

A presença do RNA do SARS-CoV-2 nos estudos avaliados foi realizada através de abordagem molecular utilizando a técnica de Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (do Inglês *reverse-transcriptase polymerase chain reaction* - RT-PCR), considerada padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19.

Quadro 1 - Características demográficas e dados extraídos dos estudos incluídos na revisão									
Referência	Local	Número total de pacientes	Sexo	Faixa etária	Pacientes com RT-PCR (+) (fezes)	Pacientes com RT-PCR (-) (fezes)	Pacientes com RT-PCR fecal (+) e RT-PCR NF (-)	Persistência da positividade fezes após PCR-NF (-) (média/dias)	Observações
Chen, et al. ⁽¹³⁾	China	133	M/F	Adultos/ Crianças	12/19	07/19	09	Média 13 dias	
Chen, et al. ⁽¹⁴⁾	China	42	M/F	Adultos	28/42	14/42	18	Média 7 dias (18 pacientes)	
Kujawski, et al. ⁽¹⁵⁾	EUA	12	M/F	Adultos	07/10	03/10	2	Média 14 dias	
Han, et al. ⁽¹⁶⁾	China	206	M/F	Adultos	12/22	10/22	0	NA	
Han, et al. ⁽¹⁷⁾	Coreia do Sul	12	M/F	Crianças	11/12	01/12	0	NA	
Kim, et al. ⁽¹⁸⁾	Coréia	74	M/F	Adultos/ Crianças	08/38	30/38	03	NA	
Lescure, et al. ⁽¹⁹⁾	França	05	M/F	Adultos	02/05	03/05	NA	NA	
Ling, et al.* ⁽¹⁰⁾	China	66	M/F	Adultos	66/66	00/66	54	Média: 20 dias - GC 11 dias - NT	Pacientes em fase convalescente
Park, et al. ⁽²⁰⁾	Coreia	46	MF	Adultos	02/46	44/46	NA	NA	Assintomáticos/ COVID leve
Tan, et al. ⁽⁹⁾	China	10	M/F	Crianças	03/04	01/04	01	NA	
Xiao, et al. ⁽³⁾	China	73	M/F	Adultos/ Crianças	39/73	34/73	17	1-12 dias	
Yun, et al. ⁽²¹⁾	China	2.510	M/F	Adultos/ Crianças	08/32	24/32	0	NA	

RT-PCR: Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase; (+): Positiva; (-): Negativa; NF: Nasofaringe; NA: Não avaliado; M: masculino; F: feminino
 * GC - pacientes tratados com glicocorticoide; NT - pacientes não tratados com glicocorticoide.

O teste de RT-PCR para COVID-19 geralmente avalia secreções respiratórias, coletadas por meio de *swabs* de orofaringe (garganta) ou nasofaringe (nariz). Entretanto, outros materiais biológicos podem ser analisados, incluindo amostras de fezes e *swabs* retais.⁽¹²⁾

Dos 369 pacientes que tiveram suas amostras de fezes avaliadas, 198 pacientes (53,6%) foram positivos para a presença do RNA do SARS-CoV-2 em pelo menos uma amostra. Em 104 (52,5%) destes pacientes, as amostras de fezes foram positivas para presença do RNA viral, enquanto que as amostras de nasofaringe, consideradas padrão para o diagnóstico da COVID-19, estavam negativas. Considerando a população total (369) que foi testada para presença de RNA do vírus nas fezes, os indivíduos positivos com pesquisa negativa em nasofaringe (104) representaram 28,2%.

A persistência da positividade para presença de RNA do SARS-CoV-2 em amostras de fezes, após negatividade do teste em amostras de nasofaringe, foi verificada em alguns estudos e variou de um a vinte dias. A maior parte dos estudos avaliados foi retrospectiva, fornecendo apenas dados de avaliações pontuais realizadas conforme os diferentes protocolos hospitalares de manejo dos pacientes com COVID-19.

DISCUSSÃO

Esta revisão demonstrou que o RNA do SARS-CoV-2 pode ser detectado em amostras de fezes de pacientes com COVID-19 em alguns casos antes da detecção nas amostras de trato respiratório, podendo ainda persistir após negatificação das mesmas. A presença do RNA viral em amostras de fezes pode ter implicações importantes tanto na propagação da doença quanto em seu diagnóstico, devendo ser considerada na elaboração de medidas preventivas e na elaboração de protocolos diagnósticos e de manejo dos pacientes com COVID-19.

Segundo os estudos avaliados nesta revisão, a positividade para RNA do SARS-CoV-2 em amostras de fezes foi de 53,6%. Em revisões realizadas por Gupta et al. e Tian et al., que também avaliaram esse mesmo parâmetro, o percentual de positividade das amostras para RNA viral foi semelhante.^(5,22) Pequenas diferenças podem estar relacionadas às particularidades dos artigos avaliados (número de participantes e de amostras avaliadas, fase da doença, etc.) e ao fato de a inclusão, pelos autores, de publicações como estudos de caso, em que 100% dos participantes apresentavam positividade para o RNA viral em amostras de fezes.

Vários autores têm sugerido a possibilidade de transmissão da COVID-19 por via fecal-oral.^(3,14,23) Essa hipótese necessita ser considerada, uma vez que, além da presença do RNA viral nas fezes de um número significativo

de pacientes, a persistência da positividade chama atenção. Estudos demonstraram que o RNA viral pode estar presente nas fezes de pacientes COVID-19, sintomáticos e assintomáticos, por longo período de tempo.^(7,14,20,24,25) Revisão publicada por Santos et al. sugeriu que, em crianças, o material genético viral pode ser detectado por maior tempo em amostra de fezes do que nas amostras de trato respiratório.⁽²⁶⁾ Liu et al. identificaram a presença de material genético do vírus em fezes de um paciente por 46 dias após alta hospitalar.⁽²⁵⁾ Wang et al. relataram três casos em que a persistência de infecção intestinal por SARS-CoV-2 após resolução da pneumonia levou à reinternação dos pacientes.⁽¹¹⁾ Na presente revisão, a maior persistência de RNA viral em amostra de fezes foi observada em estudo realizado por Ling et al., que avaliaram pacientes em fase de convalescência, ou seja, pacientes recuperados, não febris, sem sintomas respiratórios e que tiveram dois resultados de RT-PCR negativos em *swabs* orofaríngeos. Nesse estudo, o grupo de pacientes que recebeu tratamento com glicocorticoides apresentou tempo médio de depuração do RNA do SARS-CoV-2 de 20 dias e 11 dias no grupo não tratado com glicocorticoides.⁽¹⁰⁾ Segundo os autores, o tratamento com glicocorticoides deveria ser evitado no período de replicação viral, especialmente em pacientes com doença leve, uma vez que atrasa a eliminação do vírus.⁽¹⁰⁾ Ling et al. observaram ainda correlação entre a contagem de linfócitos T CD4+ e a depuração do RNA do SARS-CoV-2, destacando que quanto menor o valor absoluto dos linfócitos T CD4+ maior a duração da excreção do vírus nas fezes do paciente, sugerindo papel importante da imunidade celular na COVID-19.⁽¹⁰⁾

Apesar da confirmação da presença do RNA do vírus em amostras de fezes, muitas vezes por tempo superior à detecção em amostras de trato respiratório, a escassez de estudos relacionados à viabilidade do vírus SARS-CoV-2 nessas amostras, comprovando sua infectividade, precisa ser enfatizada. Identificou-se somente um estudo publicado em que SARS-CoV-2 viável foi isolado de dois pacientes⁽²⁾ e duas divulgações por laboratórios chineses, que afirmaram ter isolado com sucesso o SARS-CoV-2 de fezes de pacientes COVID-19 (não publicado).⁽²⁷⁾

Resultados publicados por alguns autores tornam possível inferir que não existe correlação entre a presença de sintomas gastrintestinais e a presença de RNA do SARS-CoV-2 nas fezes, uma vez que o RNA viral foi identificado em amostras de fezes de indivíduos assintomáticos,^(20,23) com sintomas respiratórios leves⁽²⁸⁾ e com pneumonia,⁽²⁹⁾ sem referência a manifestações gastrintestinais. Nesta revisão, não foi possível identificar a presença ou ausência de sintomas gastrintestinais nos pacientes positivos para presença de RNA viral nas fezes, pois nos arti-

gos avaliados as populações eram heterogêneas e os resultados não traziam essa discriminação.

A presença do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de fezes despertou para a possibilidade de utilização dessa amostra para o diagnóstico da COVID-19. Um estudo multicêntrico realizado na Alemanha comparou 11 diferentes sistemas de RT-PCR utilizados no diagnóstico da COVID-19. Diferentes diluições de RNA viral extraído de amostra de fezes de uma criança positiva para COVID-19 foram testadas e a maioria dos protocolos detectou o vírus com segurança na amostra com diluição equivalente a cinco cópias de RNA, mostrando bom desempenho e alta sensibilidade.⁽³⁰⁾

Devido ao alto índice de positividade de RNA viral em pacientes após alta hospitalar, vários autores sugeriram a inclusão da avaliação de fezes nos protocolos clínicos da COVID-19.^(10,16,21,31) Avaliando-se os dados sobre percentual de positividade das amostras de fezes extraídos das publicações exploradas nesta revisão, observou-se que a positividade foi inferior em comparação às amostras de nasofaringe. No entanto, o fato de alguns pacientes testarem positivo em amostras de fezes sem apresentarem resultados positivos em avaliações de amostras de trato respiratório, em diferentes fases da doença, apontam para a importância dessa análise em pacientes COVID-19.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O RNA do SARS-CoV-2 pode ser detectado em amostras de fezes de um percentual significativo de pacientes com COVID-19. A positividade das amostras de fezes de forma isolada pode ocorrer antes da detecção do RNA viral em amostras nasofaríngeas ou após negatização das mesmas ou resolução dos sintomas do paciente. Em muitos indivíduos, a presença de RNA viral nas fezes persiste por semanas após alta hospitalar alertando para um possível risco de transmissão. Nesse contexto, considera-se que a inclusão da pesquisa de RNA viral em amostra de fezes, na triagem e alta do paciente, seria uma boa estratégia para melhorar os índices de diagnóstico da COVID-19 e reduzir a propagação do vírus.

Limitações do estudo

Aspectos como número e características dos pacientes, momento da coleta de materiais biológicos, carga viral, dentre outros podem influenciar os resultados e precisam ser considerados na sua interpretação. Portanto, apesar da presente revisão ter identificado 53,6% de positividade para RNA de SARS-CoV-2 em amostras de fezes, não podemos confirmar esta prevalência populacional como verdadeira devido à grande variabilidade no desenho dos estudos incluídos na revisão.

Abstract

COVID-19, the disease caused by the new Coronavirus, has spread rapidly across all continents promoting a pandemic. Related studies to the pathophysiology of COVID-19 have shown that the cells of intestinal mucosa are invaded by SARS-CoV-2, being in faeces excreted, suggesting a potential faecal-oral transmission route. The presence of the virus in faeces also raised the expectation of using this biological sample for diagnostic purposes. In this mini review, we summarize recent studies related to the presence of the SARS-CoV-2 RNA in the faeces of COVID-19 patients.

Keywords

Coronavirus infections; RNA; Faeces, SARS-CoV-2, COVID-19

REFERÊNCIAS

1. Johns Hopkins University. COVID-19 [Internet]. 2020. Available at: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
2. 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 [Internet]. 11 de março de 2020; Available at: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762997>.
3. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. Gastroenterology [Internet]. maio de 2020;158(6):1831-1833.e3. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508520302821>.
4. Zhang W, Du R-H, Li B, Zheng X-S, Yang X-L, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. Emerg Microbes Infect [Internet]. 1 de janeiro de 2020;9(1):386-9. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1729071>.
5. Tian Y, Rong L, Nian W, He Y. Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. Aliment Pharmacol Ther [Internet]. maio de 2020;51(9):843-51. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.15731>.
6. Leung WK, To K, Chan PKS, Chan HLY, Wu AKL, Lee N, et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. Gastroenterology [Internet]. outubro de 2003;125(4):as0016508503012150. Available at: <http://www.mosby.com/scripts/om.dll/serve?action=searchDB&searchDBfor=art&artType=abs&id=as0016508503012150>.
7. Chen Y, Guo Y, Pan Y, Zhao ZJ. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. abril de 2020;525(1):135-40. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X20303399>.
8. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet [Internet]. fevereiro de 2020;395(10224):565-74. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620302518>.
9. Tan Y, Tan B, Pan J, Wu J, Zeng S, Wei H. Epidemiologic and clinical characteristics of 10 children with coronavirus disease 2019 in Changsha, China. J Clin Virol [Internet]. junho de 2020;127:104353. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653220300950>.
10. Ling Y, Xu S-B, Lin Y-X, Tian D, Zhu Z-Q, Dai F-H, et al. Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. Chin Med J (Engl) [Internet]. maio de 2020;133(9):1039-43. Available at: <http://journals.lww.com/10.1097/CM9.0000000000000774>.
11. Wang X, Zhou Y, Jiang N, Zhou Q, Ma W-L. Persistence of intestinal SARS-CoV-2 infection in patients with COVID-19 leads to re-admission after pneumonia resolved. Int J Infect Dis [Internet]. junho de 2020;95:433-5. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971220302794>.

12. Brasil. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Testes para COVID-19 - Perguntas e Respostas [Internet]. 2020. Available at: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/4340788/Perguntas+e+respostas+-+testes+para+Covid-19.pdf/9fe182c3-859b-475f-ac9f-7d2a758e48e7>.
13. Chen C, Gao G, Xu Y, Pu L, Wang Q, Wang L, et al. SARS-CoV-2-Positive sputum and feces after conversion of pharyngeal samples in patients with COVID-19. *Ann Intern Med* [Internet]. 16 de junho de 2020;172(12):832-4. Available at: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M20-0991>.
14. Chen Y, Chen L, Deng Q, Zhang G, Wu K, Ni L, et al. The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. *J Med Virol* [Internet]. 25 de julho de 2020;92(7):833-40. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25825>.
15. COVID-19 Investigation Team. Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. *Nat Med* [Internet]. 23 de junho de 2020;26(6):861-8. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41591-020-0877-5>. doi:10.1038/s41591-020-0877-5.
16. Han C, Duan C, Zhang S, Spiegel B, Shi H, Wang W, et al. Digestive symptoms in COVID-19 patients with mild disease severity. *Am J Gastroenterol* [Internet]. junho de 2020;115(6):916-23. Available at: <https://journals.lww.com/10.14309/ajg.0000000000000664>.
17. Han MS, Seong M-W, Kim N, Shin S, Cho SI, Park H, et al. Viral RNA load in mildly symptomatic and asymptomatic children with COVID-19, Seoul. [published online ahead of print, 2020 Jun 4]. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(10):10.3201/eid2610.202449. doi:10.3201/eid2610.202449.
18. Kim J-M, Kim HM, Lee EJ, Jo HJ, Yoon Y, Lee N-J, et al. Detection and isolation of SARS-CoV-2 in serum, urine, and stool specimens of COVID-19 patients from the Republic of Korea. *Osong Public Heal Res Perspect* [Internet]. 30 de junho de 2020;11(3):112-7. Available at: <http://ophrp.org/journal/view.php?doi=10.24171/j.phrp.2020.11.3.02>.
19. Lesure F-X, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky P-H, Behillil S, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis* [Internet]. junho de 2020;20(6):697-706. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920302000>. doi:10.1016/S1473-3099(20)30200-0.
20. Park S, Lee C-W, Park D-I, Woo H-Y, Cheong HS, Shin HC, et al. Detection of SARS-CoV-2 in fecal samples from patients with asymptomatic and mild COVID-19 in Korea. [published online ahead of print, 2020 Jun 10]. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;S1542-3565(20)30777-1. doi:10.1016/j.cgh.2020.06.005.
21. Yun H, Sun Z, Wu J, Tang A, Hu M, Xiang Z. Laboratory data analysis of novel coronavirus (COVID-19) screening in 2510 patients. *Clin Chim Acta*. 2020;507:94-97. doi:10.1016/j.cca.2020.04.018.
22. Gupta S, Parker J, Smits S, Underwood J, Dolwani S. Persistent viral shedding of SARS-CoV-2 in faeces - a rapid review. *Color Dis* [Internet]. 4 de junho de 2020;22(6):611-20. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/codi.15138>.
23. Tang A, Tong Z, Wang H, Dai Y, Li K, Liu J, et al. Detection of Novel Coronavirus by RT-PCR in Stool Specimen from Asymptomatic Child, China. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(6):1337-1339. doi:10.3201/eid2606.200301.
24. Kipkorir V, Cheruiyot I, Ngure B, Misiani M, Munguti J. Prolonged SARS-Cov-2 RNA detection in anal/rectal swabs and stool specimens in COVID-19 patients after negative conversion in nasopharyngeal RT-PCR test. *J Med Virol* [Internet]. 13 de maio de 2020;jmv.26007. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.26007>.
25. Liu P, Cai J, Jia R, Xia S, Wang X, Cao L, et al. Dynamic surveillance of SARS-CoV-2 shedding and neutralizing antibody in children with COVID-19. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 1 de janeiro de 2020;9(1):1254-8. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1772677>.
26. Santos VS, Gurgel RQ, Cuevas LE, Martins-Filho PR. Prolonged fecal shedding of SARS-CoV-2 in pediatric patients. A quantitative evidence synthesis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 22 de maio de 2020;Publish Ah. Available at: <https://journals.lww.com/10.1097/MPG.0000000000002798>.
27. Gu J, Han B, Wang J. COVID-19: Gastrointestinal Manifestations and Potential Fecal-Oral Transmission. *Gastroenterology*. 2020;158(6):1518-1519. doi:10.1053/j.gastro.2020.02.054.
28. Nicastrì E, D'Abramo A, Faggioni G, De Santis R, Mariano A, Lepore L, et al. Coronavirus disease (COVID-19) in a paucisymptomatic patient: epidemiological and clinical challenge in settings with limited community transmission, Italy, February 2020. <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.11.2000230>.
29. Zhang J, Wang S, Xue Y. Fecal specimen diagnosis 2019 novel coronavirus-infected pneumonia. *J Med Virol* [Internet]. 12 de junho de 2020;92(6):680-2. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25742>.
30. Muenchhoff M, Mairhofer H, Nitschko H, Grzimek-Koschewa N, Hoffmann D, Berger A, et al. Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2, Germany, March 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 18 de junho de 2020;25(24). Available at: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.24.2001057>.
31. Li Y, Hu Y, Yu Y, Zhang X, Li B, Wu J, et al. Positive result of Sars-CoV-2 in faeces and sputum from discharged patient with COVID-19 in Yiwu, China. [published online ahead of print, 2020 Apr 20]. *J Med Virol*. 2020;10.1002/jmv.25905. doi:10.1002/jmv.25905.

Correspondência

Cleonice Maria Michelon

*Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima – Trindade
88 040-900 – Florianópolis -SC, Brasil*

A COVID-19 e o diagnóstico da aspergilose pulmonar invasiva

COVID-19 and the invasive pulmonary aspergillosis diagnosis

Paulo Murillo Neufeld

Resumo

O diagnóstico da aspergilose pulmonar associada à Covid-19 tem se mostrado um dilema na clínica médico-cirúrgica e na medicina laboratorial. O correto diagnóstico é crítico porque a coinfeção por *Aspergillus* spp. em pacientes com grave pneumonia por COVID-19 leva a uma Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). Como para a COVID-19 protocolos específicos ainda não foram produzidos, têm sido utilizados aqueles empregados para o diagnóstico da aspergilose pulmonar associada à influenza com adaptações dos critérios do consórcio formado pela Organização Europeia para a Investigação e Tratamento do Câncer (EORTC) e pelo Grupo de Estudos de Micoses do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (MSG) e dos critérios para pacientes hospitalizados em UTI (AspICU). O estabelecimento de definições para a classificação de pacientes com aspergilose pulmonar associada à COVID-19, com vistas ao manejo e tratamento, representa um importante desafio.

Palavras-chave

COVID-19; Influenza; Aspergilose invasiva; Diagnóstico

DOENÇA PELO CORONAVÍRUS-19 (COVID-19)

No final do mês de dezembro de 2019, uma série de casos de pneumonia de origem desconhecida foi identificada na província de Hubei, em Wuhan, na China continental.⁽¹⁾ Um grande número de pacientes se dirigiu, de forma simultânea, a diversos hospitais da localidade, exibindo importante sintomatologia respiratória, que era semelhante a um quadro viral, com febre e tosse seca e imagens radiológicas incompatíveis com aquelas de uma pneumonia viral comum ou mesmo de uma pneumonia de origem bacteriana. Estudos epidemiológicos, que foram imediatamente levados a curso, vincularam esses casos a um mercado popular de alimentos e víveres de Hubei.⁽²⁾ Tipicamente, esse mercado comercializava produtos de origem animal, não só de animais de produção, como bovinos, ovinos, caprinos, suínos, aves e ovos e pescados, mas também de animais exóticos e selvagens. Muitos desses animais, inclusive, eram comercializados vivos ou não processados.⁽³⁾

As primeiras investigações incriminaram alguns animais como possíveis portadores do vírus SARS-CoV-2 (família Coronaviridae), agente da COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) que teria sido transmitido às pessoas que frequentavam o mercado, em decorrência das baixas con-

dições higiênico-sanitárias do estabelecimento.⁽⁴⁾ Inicialmente considerou-se a possibilidade de alguns tipos de serpentes serem o reservatório do vírus. No entanto, essa hipótese foi depois abandonada pela maioria dos autores porque não há comprovação científica de que répteis possam ser infectados ou servir de hospedeiro para o vírus, bem como, ao mesmo tempo, não há evidências de que esse vírus tenha hospedeiros que não sejam aves ou mamíferos.^(3,4)

Atualmente considera-se que os morcegos sejam os hospedeiros primários do SARS-CoV-2 e que o vírus, antes de chegar aos seres humanos, passa por hospedeiros intermediários como o pangolim.⁽⁴⁾ A razão para que esses animais sejam considerados os reservatórios do vírus encontra fundamento nas análises e comparações moleculares feitas com os Coronavírus isolados desses animais e o SARS-CoV-2. O resultado dessas investigações demonstraram uma identidade genômica elevada entre os vírus.⁽⁴⁾

Estudos moleculares têm indicado também que os morcegos são, da mesma forma, os hospedeiros primários dos Coronavírus agentes da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), que ocorreu em 2003, e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), que ocorreu em 2012.⁽⁵⁾ Nessas duas síndromes, tanto o SARS-CoV quanto o MERS-CoV passaram, igualmente, por hospedei-

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Instituição: Laboratório de Micologia Médica e Forense. Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 03/08/2020
Artigo aprovado em 17/08/2020
10.21877/2448-3877.20200019

ros intermediários, como a civeta (SARS-CoV) e o dromedário (MERS-CoV), antes de infectarem os seres humanos.

De acordo com os relatos iniciais dos pesquisadores chineses, nem todos os indivíduos identificados com sintomatologia de COVID-19 tinham relação com o mercado em Wuhan, já que dos 59 pacientes reportados apenas 27 tinham efetivamente contato direto com esse estabelecimento. Os outros pacientes eram, na sua maioria, familiares que tinham entrado em contato com pessoas enfermas no convívio doméstico. Esse fato pôs em perspectiva duas rotas de transmissão viral, uma animal-humano e outra humano-humano.⁽⁵⁾ No mercado foi favorecida a interação animal-humano, onde o vírus pode saltar a barreira da espécie e contaminar o homem pelo contato com sangue, excreções, secreções e fluidos contaminados de animais vivos ou sem processamento. O mecanismo de transmissão humano-humano, por sua vez, segue um padrão semelhante, ocorrendo pelo contato com mãos, aerossóis e secreções de pessoas infectadas, bem como fômites contaminados. Em ambas as rotas de transmissão, a via aerógena é de extrema importância para a propagação do vírus. Uma via oral-fecal tem sido também observada.⁽³⁾

Em conformidade com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), esse vírus se encontra classificado no super-reino Riboviria, ordem Nidovirales, família Coronaviridae, subfamília Orthocoronavirinae e gênero Betacoronavirus, que contém, então, a espécie SARS-CoV-2. Importa mencionar que a família Coronaviridae é composta ainda pelos gêneros *Alphacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Dentre esses gêneros, os únicos que são capazes de produzir infecção em homens e animais, ocasionando sintomas respiratórios, gastrointestinais, hepáticos e neurológicos, são os *Betacoronavirus* e os *Alphacoronavirus*.⁽⁴⁾ Em decorrência das endemias e pandemias causadas por membros da família Coronaviridae, essa tem adquirido grande relevância em saúde pública.⁽²⁾

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de cadeia simples (27 a 32 kilobases), não segmentado e com polaridade positiva, envolvido por um envelope bilipídico. Esse vírus exibe uma morfologia pleomórfica, habitualmente arredondada ou esférica, e dimensões de cerca de 50 nm a 200 nm. O envelope viral apresenta três proteínas estruturais em sua superfície, a proteína espicular S, a proteína da matriz/membrana M e a proteína de envelope E, que desempenham diferentes funções no processo de montagem viral e de infecção celular.⁽⁴⁾ No envelope está presente ainda a enzima hemaglutinina-esterase que, igualmente, contribui com o processo infeccioso. No interior do vírus encontra-se a proteína nucleocapsídica N, que também é uma proteína estrutural e está associada à proteção do RNA.⁽³⁾

Uma vez que tenha ocorrido a inalação, ingestão, inoculação ou autoinoculação das partículas virais, o pro-

cesso de infecção pode ter início. A incorporação do SARS-CoV-2 às células respiratórias do hospedeiro (pneumócitos tipo 2) ocorre quando o complexo proteína espicular S do envelope viral (domínios S1 e S2) entra em contato com seu receptor, a Enzima Convertidora de Angiotensina II (ECA2), presente na membrana celular.^(2,4) Ao mesmo tempo, o complexo proteína S interage com a Proteinase Transmembranar Serina 2 (TMPRSS2), que também colabora decisivamente para a infecção. Resumidamente, a ECA 2 promove a fusão entre a superfície do vírus e a membrana plasmática e a TMPRSS2 facilita, na sequência, a entrada do RNA na célula alvo.^(3,4) A penetração do vírus ocorre por endocitose ou formação de vesícula intracelular. Dentro da célula inicia-se a etapa de biossíntese com a transcrição, a tradução e a replicação do RNA viral, utilizando o maquinário enzimático do hospedeiro. Uma vez terminado o processo de síntese proteica e multiplicação genômica, as cópias virais passam a ser montadas no Retículo Endoplasmático e no Complexo de Golgi. Por fim, os vírus são liberados através de exocitose ou por ruptura da célula, iniciando, massivamente, novos ciclos infecciosos.⁽⁴⁾

Do ponto de vista fisiopatológico, a origem dos sintomas mais graves apresentados pelos pacientes com COVID-19 é explicada pela ativação do sistema imunológico conato. O SARS-CoV-2 pode desencadear uma resposta imunológica excessiva e desregulada com massivo recrutamento de macrófagos e polimorfonucleares e hiperativação e liberação de citocinas, quimiocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (Tempestade de Citocina), que é ineficaz para a contenção do vírus, mas sendo, ao contrário, produtora de enorme dano tissular.⁽³⁾ Esse processo inflamatório agressivo e aberrante pode causar a síndrome da angústia respiratória grave (SARG) [síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) ou síndrome do desconforto respiratório grave (SDRG) ou síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) ou ainda síndrome respiratória aguda grave (SARS)], que pode levar a um desfecho fatal.⁽⁶⁾

O curso clínico da COVID-19 pode ser distribuído em três fases. Na fase I, o vírus se replica na mucosa respiratória e ocorre viremia, os sintomas são aqueles de infecção respiratória, como tosse seca e febre, podendo ocorrer gastroenterite com vômito e diarreia. Uma linfopenia costuma aparecer. Na fase II, a infecção chega aos pulmões e continuam a tosse e a febre. A pneumonia pode ser leve ou se mostrar com sintomas mais graves (taquipneia, hipóxia). A linfopenia se acentua e pode haver uma elevação nos níveis de Dímero D.^(3,4) A partir desse momento, a evolução pode ser favorável, com eliminação do vírus e progressivo desaparecimento dos sintomas, ou o doente pode entrar num estado crítico, que caracteriza a fase III. Nessa última fase ocorre extrema dificuldade respiratória (necessidade de ven-

tilação assistida) e um quadro de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) com hipotermia, taquipneia, taquicardia, hipotensão, podendo chegar a um choque séptico (hipotensão refratária, coagulação intravascular, isquemia de extremidades, falência múltipla dos órgãos). Marcadores de inflamação (proteínas de fase aguda, ferritina) podem estar também elevados nesse estágio da doença.⁽⁴⁾

COINFEÇÕES VIRAIS, BACTERIANAS E FÚNGICAS

A pandemia da COVID-19 é uma emergência global em saúde pública que tem sido aprendida em tempo real.⁽⁵⁾ Na medida da passagem dos acontecimentos, vai se construindo um melhor entendimento acerca da história natural da doença.^(5,7) Com isso, o controle e a prevenção da enfermidade, bem como o manejo dos pacientes acometidos vão se tornando mais efetivos. A COVID-19 é uma síndrome e diversas intercorrências surgem ao longo da evolução da doença, solicitando da comunidade científica, de forma urgente, posições resolutivas. Nesse contexto, uma das intercorrências que começam a ter maior destaque na literatura médica é aquela associada às coinfeções.^(4,8,9)

Apesar da limitada experiência clínica com respeito às complicações decorrentes de infecções concomitantes por diferentes patógenos na COVID-19 pode-se esperar certa correlação com o que já foi descrito para outras pandemias como, por exemplo, aquela causada pelo vírus da influenza.⁽¹⁰⁾ Na pandemia por influenza, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* foram as bactérias copatogênicas mais prevalentes, contudo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* foram também relatadas. Agentes virais como o Rinovírus (hRV), Metapneumovírus Humano (hMPV), Adenovírus (AdV), Vírus Sincicial Respiratório (RSV) e Coronavírus Humano (HCoV) já foram, igualmente, reportados em coinfeções. Relativamente aos fungos, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* foram os mais isolados entre os casos de comorbidade infecciosa. Ainda com referência às doenças fúngicas secundárias, no surto causado pelo SARS-CoV-1, em 2003, foram também informados quadros de infecção invasiva determinados pelo *Aspergillus* spp., inclusive, com desfecho fatal.⁽¹¹⁾

Na COVID-19, como era esperado, o relato de coinfeções tem se tornado cada vez mais recorrente. A presença de outros microrganismos como vírus, bactérias e fungos é sempre um fator crítico que pode aumentar as dificuldades para o diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença pelo SARS-CoV-2, bem como agravar os sintomas e elevar as taxas de mortalidade.⁽¹²⁾ Os estudos atuais in-

formam coinfeções com o vírus da influenza A e B (FluA, FluB), hRV, AdV, Parainfluenza tipos 1, 2, 3, 4 (PIV1, PIV2, PIV3, PIV4), Coronavírus HKU1 (HKU1), Coronavírus não-COVID-19, hMPV, RSV, *M. pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*. Outros vírus como HIV, Hepatite e Citomegalovírus (CMV) têm sido observados. *Acinetobacter baumannii*, *Actinomyces* spp., *K. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Rothia* spp., *Streptococcus* spp. e *Veillonella* spp. são algumas das bactérias que aparecem em associação com a COVID-19.^(12,13) Os patógenos fúngicos mais reportados são aqueles comumente encontrados em infecções oportunistas que acometem os pacientes imunocomprometidos como o *Aspergillus* spp., *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.^(12,14)

A taxa de coinfeção viral não é alta na COVID-19 e isso parece estar relacionada a uma certa vantagem competitiva que o SARS-CoV-2 exibe em relação aos outros vírus respiratórios.⁽¹⁴⁾ As coinfeções por vírus estão geralmente associadas à necessidade de abordagens clínico-laboratoriais mais complexas, maior tempo de internação e elevado risco de desenvolvimento de SDRA. Não há dúvidas de que as coinfeções virais causam sérios danos ao sistema imunológico, levando a uma COVID-19 mais grave e destrutiva. Além de causar distúrbios na imunidade, outros mecanismos deletérios importantes sobre o sistema de defesa incluem lesões no epitélio das vias aéreas e redução da depuração mucociliar, o que favorece a implantação de novos vírus.^(14,15)

Em relação à ocorrência de coinfeções bacterianas e fúngicas, essas têm sido observadas tanto em pneumonias virais, uma situação recorrente, como na COVID-19, quando os pacientes se encontram gravemente enfermos.⁽¹²⁾ Dados clínicos, contudo, mostram uma baixa taxa de coinfeção por bactérias e fungos nas infecções pelo SARS-CoV-2, e isso pode ser devido à antibioticoterapia extensiva empregada na fase inicial da doença. As coinfeções bacterianas e fúngicas influenciam também no grau de inflamação sistêmica e, em consequência, na progressão e prognóstico da COVID-19, o que pode levar a um aumento dos cuidados intensivos do uso de antibióticos e das mortes ou, pelo menos, produzir um atraso no tempo de cura.^(14,16)

Em pacientes graves com COVID-19, as citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-6, associadas à lesão pulmonar, têm sido bastante reportadas em diferentes estudos. A infecção por SARS-CoV-2 pode causar danos aos linfócitos, especialmente células B, células T e células NK, o que pode levar ao comprometimento do sistema imunológico durante o período da doença. A diminuição dos linfócitos e da função imunológica do hospedeiro pode ser uma das principais razões para as coinfeções por ambos os grupos de microrganismos, notadamente para fungos como o *Aspergillus* spp. e a *Candida* spp.⁽⁵⁾ De fato, parece ha-

ver certa interação inflamatória entre as bactérias ou os fungos e o SARS-CoV-2. Além do *status* imunológico alterado e da antibioticoterapia prolongada, pacientes gravemente enfermos têm maior probabilidade de receber tratamentos com cateteres invasivos e serem submetidos à ventilação mecânica, resultando também em maior sensibilidade a infecções secundárias, principalmente por patógenos multirresistentes.^(12,14)

A infecção do SARS-CoV-2 nas células intestinais pode levar a alterações da microbiota intestinal e a sintomas gastrointestinais. Coinfecções também podem alterar a homeostase intestinal, aumentando a intensidade da infecção e estimulando as células imunológicas a produzirem uma resposta inflamatória mais aguda.⁽¹⁷⁾ A diversidade da microbiota intestinal de pacientes com COVID-19 se altera significativamente. O número relativo de agentes bacterianos e fúngicos oportunistas e patogênicos tende a ser maior, enquanto que a quantidade daqueles microrganismos benéficos claramente diminui. O desequilíbrio da microbiota pode ser de curso longo, e, no caso dos fungos, alterações intestinais podem ser observadas por até 12 dias após não se identificar mais o SARS-CoV-2 em amostras de nasofaringe. Na realidade, o que parece ocorrer é que a microbiota intestinal pode tanto regular quanto ser regulada por microrganismos invasores, induzindo, com isso, a efeitos estimuladores ou supressores, durante o curso da virose.^(14,17)

DIAGNÓSTICO CLÍNICO-LABORATORIAL DA ASPERGILOSE PULMONAR INVASIVA ASSOCIADA À COVID-19

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas têm sido associadas a importantes quadros de morbimortalidade, especialmente em indivíduos que apresentam grave comprometimento de seu sistema imunológico.⁽¹⁸⁾ De acordo com a literatura, em torno de 1 bilhão de pessoas apresentam manifestações clínicas primárias e/ou secundárias relacionadas a infecções superficiais, subcutâneas e invasivas e cerca de 1,6 milhão morrem todos os anos, principalmente em decorrência de complicações determinadas por micoses sistêmicas.^(3,4,19,20) Apesar das infecções invasivas por esses organismos apresentarem taxas de incidência mais baixas do que aquelas tegumentares, exibem percentuais de mortalidade extremamente elevados. Os principais agentes envolvidos em casos clínicos com desfecho fatal são o *Aspergillus* spp. (30%-95%), a *Candida* spp. (46%-75%), o *Cryptococcus* spp. (20%-70%), os membros da ordem Mucorales (30%-90%) e o *Pneumocystis* sp. (20%-80%).⁽¹⁸⁾

Desde que os hospedeiros se encontrem hígidos, os mecanismos de defesa compostos pela barreira cutâneo-mucosa, processo inflamatório e sistema imune são efeti-

vos na proteção frente às infecções fúngicas. No entanto, essas infecções podem se estabelecer quando ocorrem rupturas das defesas dos pacientes por processos patológicos e/ ou iatrogênicos.⁽²¹⁾ Doenças de base de origem microbiana, neoplásica, metabólica e degenerativa, além de intervenções e procedimentos médicos (cateterização, ventilação mecânica, cirurgias) e farmacológicos (antibioticoterapia, corticoterapia, cistostáticos) para suporte e tratamento podem tornar os indivíduos extremamente suscetíveis.⁽²²⁾ Dentre os agentes fúngicos secundários, o gênero *Aspergillus* spp. tem sido preponderante, cursando de forma grave, especialmente em casos de infecção pulmonar. Tomando-se em perspectiva a aspergilose pulmonar crônica, para uma rápida abordagem epidemiológica, tem sido relatada, para essa condição, uma frequência de 200 mil casos por ano e um total de 3 milhões de pessoas acometidas em todo o mundo. Após seu diagnóstico, pode-se ainda contabilizar mais de 15% de mortes nos primeiros seis meses de doença, o que representa, aproximadamente, cerca de 450 mil óbitos somente na fase inicial dessa enfermidade.⁽²³⁾ Importa mencionar também que, quando equívocos de diagnóstico ou demoras na definição da etiologia ocorrem, a aspergilose pulmonar invasiva pode atingir taxas de até 100% de mortalidade. Todavia, quando diagnosticada e tratada em tempo hábil pode exibir taxas de mortalidade mais favoráveis e inferiores a 50%.⁽²⁴⁾

Em decorrência da criticidade das doenças pulmonares por *Aspergillus* spp., faz-se necessária uma aproximação conceitual com seus quadros mórbidos mais comuns. Do ponto de vista clínico, a aspergilose pulmonar e das vias aéreas pode ser dividida em formas distintas como a aspergilose broncopulmonar alérgica, o aspergiloma, a aspergilose pulmonar crônica, que é composta pela aspergilose cavitária crônica, aspergilose fibrosante crônica e aspergilose necrosante crônica (semi-invasiva ou invasiva subaguda), a aspergilose invasiva aguda e a traqueobronquite (colonizante ou obstrutiva, invasiva, ulcerativa e pseudomembranosa) e a rinosinusite alérgica e invasiva (crônica ou aguda). Dependendo da via de infecção, a aspergilose pode ser ainda classificada em não angioinvasiva, angioinvasiva ou broncoinvasiva (vias aéreas). Todas essas formas são produzidas, majoritariamente, pelo *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, e *A. niger*, que são cosmopolitas e ubiqüitários e têm na inalação de seus esporos (conídios) a principal via de acesso pulmonar.^(24,25) Nos processos irritativos, observa-se uma reação de hipersensibilidade complexa, que é produzida pela colonização fúngica das vias aéreas, levando à obstrução bronquial, inflamação e impactação mucosa que determinam bronquiectasias, fibrose e comprometimento respiratório. O incremento da resposta Th2 dos linfócitos e a produção de interleucinas 4, 5 e 13 conduzem a uma eosinofilia e ao aumento de IgE sérica.⁽²³⁾ Nos tecidos, os conídios são eli-

minados por macrófagos alveolares que, além da fagocitose após o reconhecimento dos antígenos da parede celular dos elementos do *Aspergillus* spp., secretam mediadores inflamatórios que favorecem o recrutamento de neutrófilos e a ativação da imunidade celular, que é determinante para a eliminação de hifas.⁽²⁵⁾

Como mencionado anteriormente, a aspergilose broncopulmonar alérgica é uma resposta imunológica exagerada do hospedeiro à colonização das vias aéreas mediada por reação de hipersensibilidade tipo I e II, que leva a danos às áreas acometidas. A maioria dos casos ocorre em pessoas com asma de longa duração ou fibrose cística. Clinicamente, evolui com tosse, febre, mal-estar, dor torácica, expectoração com tampões mucosos escuros, hemoptise ocasional e sinais de obstrução. Os achados radiográficos exibem infiltrados parenquimatosos nos lóbulos superiores, atelectasias e bronquiectasias.⁽²⁵⁾

O aspergiloma representa a colonização de uma cavidade pulmonar preexistente que esteja conectada a um bronquíolo. Não há invasão tecidual produzindo uma reação tissular leve. Do ponto de vista anatomopatológico, o aspergiloma é um agregado de hifas, mucina, fibrina e células inflamatórias. Normalmente são lesões únicas e observadas com maior frequência nos lobos superiores.⁽²⁶⁾ Em geral, os pacientes são imunocompetentes e as cavidades originadas previamente por tuberculose, sarcoidose e doença obstrutiva crônica entre outras etiologias. Essa condição pode ser assintomática ou apresentar hemoptise e, eventualmente, tosse e dispneia. As imagens radiológicas mostram uma massa sólida arredondada, ocupando parcialmente o interior de uma cavidade e separada de suas paredes por um anel de ar (sinal do crescente aéreo).⁽²⁵⁾ O aspergiloma pode ser móvel e a tomada de imagens em posições diferentes pode demonstrar a mobilidade da estrutura. Nódulos aspergiliares não cavitários (<3 cm) podem ser incidentalmente observados também em achados radiográficos e sua importância reside no fato de poderem mimetizar lesões malignas até que biópsias revelem a real etiologia desses achados.⁽²⁴⁾

A aspergilose pulmonar crônica inclui distintos quadros clínicos e sua diferença para a aspergilose pulmonar aguda é a duração dos sintomas normalmente superior a três meses. A doença costuma afetar tanto pacientes imunocompetentes quanto aqueles com um imunocomprometimento mais brando.^(23,26) Uma de suas condições é a aspergilose cavitária crônica (aspergiloma complexo), que produz uma ou mais cavidades no parênquima pulmonar durante vários meses nas áreas superiores dos pulmões. Com a evolução dessas lesões podem ser desencadeados processos fibróticos que caracterizam a aspergilose fibrosante crônica. Comumente, essas formas acometem pacientes imunocompetentes, mas também indivíduos com tuberculose, tumores pulmonares, pneumotórax, doença

obstrutiva crônica e aspergilose broncopulmonar.⁽²⁶⁾ A aspergilose necrosante crônica (semi-invasiva ou subaguda) corresponde a uma infecção invasiva local que cursa de maneira indolente, evoluindo ao longo de semanas ou meses. A doença é um processo invasivo e cavitário do parênquima pulmonar. Invasão vascular e disseminações para outros órgãos são pouco frequentes. Ocorrem tipicamente em indivíduos com baixo grau de imunocomprometimento ou com uma enfermidade crônica, ou certos fatores predisponentes (*diabetes mellitus*, alcoolismo, má nutrição, pneumoconiose, doença pulmonar obstrutiva crônica, enfarte do miocárdio, corticoterapia). Os pacientes quase sempre apresentam sintomas constitucionais (febre, mal-estar, fadiga, perda de peso) acompanhados de tosse produtiva crônica ou hemoptise. As imagens radiográficas mostram consolidação crônica ou múltiplos nódulos em um ou ambos os lobos superiores que tendem progressivamente a produzir cavitações. Classicamente, os achados radiológicos tendem a evoluir com o tempo.⁽²³⁾

A aspergilose pulmonar invasiva é a manifestação clínica mais frequente da doença sistêmica causada por membros do gênero *Aspergillus*. A taxa de mortalidade em indivíduos imunocomprometidos pode variar entre 38% a 75%, alcançando percentuais de até 90% em pacientes submetidos a transplantes de medula óssea. Entre os fatores de risco para a aquisição dessa condição, a neutropenia é preponderante, sendo especialmente crítica em contagens de neutrófilos menores do que 500 células/mm³ por mais de dez dias. Uma forte correlação é observada entre a duração e o grau de neutropenia e o risco de desenvolvimento de infecção invasiva. O risco de infecção tem sido estimado em cerca de 1% ao dia nas três primeiras semanas e em torno de 4,3% nos dias subsequentes (24 a 36 dias).^(23,25) Uma forma angioinvasiva pode estar ainda presente, principalmente nos pacientes neutropênicos, que exibem rápido curso com deterioração clínica, ocorrendo em algumas horas ou alguns dias. A invasão de hifas no endotélio dos vasos produz trombose com isquemia, necrose tissular e disseminação hematogênica. Outros processos associados à aspergilose pulmonar invasiva incluem transplantes de medula óssea e órgãos sólidos, terapias prolongadas e com altas doses de corticoides e citostáticos, tumores hematológicos e doença granulomatosa crônica. Pacientes imunocompetentes (ou não neutropênicos), mas gravemente enfermos, tais como aqueles com aguda influenza A e B, doença hepática ou doença pulmonar obstrutiva crônica têm se mostrado também susceptíveis. A aspergilose pulmonar invasiva pode cursar com uma sintomatologia inespecífica, mas, em geral, estão presentes febre resistente a antibioticoterapia, dor pleural e tosse. Dispneia, produção de escarro e hemoptise também são observadas.⁽²⁵⁾ As imagens de tórax costumam apresentar um ou múltiplos nódulos com ou sem cavitação,

consolidação segmentar, infiltrado peribronquial ou derrame pleural. Em pacientes neutropênicos, os achados radiológicos iniciais podem revelar nódulos com um contorno atenuado ao seu redor com aspecto de "vidro fosco" e que representa hemorragia, necrose e edema alveolar circundante à lesão (sinal do halo). Apesar do sinal do halo ser um achado altamente sugestivo de aspergilose angioinvasiva, esse não é patognomônico de aspergilose invasiva, já que está presente em amplo espectro de outras doenças pulmonares.⁽²³⁾

A traqueobronquite aspergilar é uma patologia quase exclusiva de pacientes imunocomprometidos (transplantados de pulmão e HIV+), apesar de haver relatos da doença em indivíduos imunocompetentes. Esse processo é uma condição especial de aspergilose invasiva das vias aéreas (aspergilose broncoinvasiva) que inclui bronquite, bronquiolite broncopneumonia e pneumonia lobular e que não apresenta invasão vascular.^(24,26) Em geral, com sintomas leves e inespecíficos, observam-se dispneia, tosse, dor torácica, hemoptise e expectoração de moldes mucosos. Casos de pacientes assintomáticos, contudo, podem ocorrer. Diferentes padrões têm sido descritos: a traqueobronquite/bronquite obstrutiva está associada à formação de tampões mucosos decorrentes do crescimento de hifas nas vias aéreas, tem pouca produção de muco e nenhuma ou mínima invasão; a traqueobronquite pseudomembranosa se caracteriza por extensa inflamação e invasão da árvore brônquica e presença de membranas e detritos necróticos sobre a mucosa branquial; a traqueobronquite ulcerativa representa uma invasão focal da mucosa traqueobranquial por hifas do *Aspergillus* spp., geralmente nos pontos de sutura do transplante pulmonar. Os achados radiográficos não são específicos, mas podem mostrar colapso lobular ou segmentar e consolidações peribronquiais.^(26,27)

Outros processos clínicos associados ao *Aspergillus* spp. são a bola fúngica sinusal, a sinusite alérgica e a sinusite invasiva. A bola fúngica do seios nasais representa uma colonização fúngica sem invasão do espaço sinusal. A clínica mais frequente é a obstrução nasal, rinorreia e algia craneofacial. Achados radiográficos inespecíficos podem exibir microcalcificações intrassinuais. A doença alérgica, por sua vez, caracteriza-se por uma reação de hipersensibilidade crônica dos seios paranasais, com formação de pólipos, mas sem invasão óssea, asma, eczema ou rinite. Sintomas de cefaleia e obstrução podem estar presentes. Altos níveis de IgE podem ser detectados.⁽²⁸⁾ Uma doença invasiva dos seios paranasais também pode ser observada. Como na forma invasiva pulmonar, sinusites invasivas agudas e crônicas têm sido reportadas. A sinusite aguda é mais comum em pacientes neutropênicos graves e transplantados de medula óssea. A forma crônica ocorre em pacientes com graus leves de imunocomprometimentos ou imunocompetentes. Clinicamente, a doença aguda tem sin-

tomas pouco específicos que incluem febre, tosse, epistaxe, descarga e obstrução nasal, tumefação orbital e dor facial. Essa condição pode ocorrer concomitantemente com a aspergilose pulmonar invasiva.⁽²⁹⁾ As imagens radiográficas, em geral, são pouco sensíveis ou específicas, contudo, mostram opacidade e destruição óssea. A sinusite crônica, igualmente, tem sintomas pouco específicos, porém, caracterizam-se por uma evolução lenta, durante meses, e que podem levar a transtornos visuais, cefaleia e sintomas neurológicos. As imagens radiográficas se assemelham àquelas da forma invasiva aguda.^(29,30)

Importa mencionar que o diagnóstico de todos esses quadros clínicos associados aos fungos do gênero *Aspergillus* spp. se constitui em um enorme desafio médico e laboratorial, tendo em vista a condição de base dos pacientes ser geralmente crítica em decorrência da existência de diferentes comorbidades e fatores de risco consumptivos.^(31,32) Nesse sentido, critérios apropriados de diagnóstico são fundamentais para o manejo e o tratamento de pacientes com infecções fúngicas sistêmicas, em particular para aqueles com aspergilose pulmonar de origem viral, eventualmente causada pelo vírus da influenza ou pelo SARS-CoV-2.⁽³³⁾ Atualmente, os critérios estabelecidos e recomendados pelo consórcio formado pela Organização Europeia para a Investigação e Tratamento do Câncer (EORTC) e pelo Grupo de Estudos de Micoses do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (MSG) são os mais aceitos e utilizados. Essas recomendações diagnósticas foram recentemente revisadas para incluir novos testes de diagnóstico, grupos particulares de agentes fúngicos e populações especiais de pacientes.⁽²²⁾

De acordo com o grupo EORTC/MSG, a doença fúngica pode ser classificada em doença provada (pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes), doença provável (pacientes imunocomprometidos) e doença possível (pacientes imunocomprometidos). A definição dessas categorias é procedida após a análise de uma combinação de fatores relacionados ao paciente, tais como fatores do hospedeiro (doença de base e fatores predisponentes iatrogênicos), fatores clínicos (apresentação clínica e radiográfica) e fatores micológicos (determinações diretas e/ou indiretas do elemento fúngico)^(22,34) (Tabela 1).

O diagnóstico provado requer um alto grau de certeza, ou seja, uma evidência tecidual (exame direto, histopatologia, citopatologia e/ou biologia molecular) e cultural (incluindo hemocultura) incontestável de infecção por fungo filamentosos em amostras estéreis.⁽³⁴⁾ Já o diagnóstico provável baseia-se numa associação entre os fatores do hospedeiro, fatores clínicos e fatores micológicos. Nesse grupo, há um menor grau de certeza micológica, pois a visualização microscópica dos elementos fúngicos, o iso-

Tabela 1. Critérios da Organização Europeia para Investigação e Tratamento do Câncer/ Grupo de Estudos de Micoses do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (EORTC/ MSG) para a Aspergilose Pulmonar Invasiva Provada, Provável e Possível

ASPERGILOSE PULMONAR INVASIVA PROVADA
<p>Amostras de sítios estéreis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microscopia: Exame direto, histopatologia, citopatologia de espécimens obtidos por punção ou biopsia com visualização de hifas septadas, hialinas e ramificadas em ângulo agudo associadas a sítio com evidência de destruição tecidual • Cultura: Recuperação de <i>Aspergillus</i> spp. associada a sítio com evidência clínica e radiológica de doença infecciosa (exceto LBA, urina e seios paranasais e cavidade mastoidea) • Biologia Molecular: Amplificação por PCR e sequenciamento de DNA fúngico, quando esses agentes forem observados em espécimens fixados em formol e parafinados
ASPERGILOSE PULMONAR INVASIVA PROVÁVEL (Todos os 3 critérios devem estar presentes)
<p>Amostras de sítios não estéreis:</p> <p>Critérios do Hospedeiro (Um dos fatores deve estar presente):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Recente história de neutropenia (<500 neutrófilos/mm³ por > 10 dias) • Transplante alogênico de células tronco • Doença hematológica maligna • Transplante de órgãos sólidos • Corticoterapia prolongada com dose ≥0,3mg/Kg/d por ≥ 3 semanas nos últimos 60 dias • Tratamento com outros imunossuppressores de células T nos últimos 90 dias • Tratamento com imunossuppressores de células B • Imunocomprometimento grave • Doença enxerto-contra-hospedeiro grau III ou IV <p>Critérios Clínicos (Um dos sinais deve estar presente):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lesões bem circunscritas, densas com ou sem Sinal do Halo • Sinal do Crescente Aéreo • Cavitações • Consolidação lobular ou segmental em forma de cunha <p>Critérios Micológicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microscopia: Exame direto, histopatologia, citopatologia com visualização de elementos fúngicos de espécimens de escarro, LBA, escovamento brônquico, aspirado traqueal • Cultura: recuperação de <i>Aspergillus</i> spp. de espécimens de escarro, LBA, escovamento brônquico, aspirado traqueal • Não Cultural: detecção de antígenos ou constituintes de parede: galactomanana em soro, plasma, LBA: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Antígeno de galactomanana detectada no soro ou LBA (Um dos critérios deve estar presente): <ul style="list-style-type: none"> ✓ Soro ou plasma: ≥ 1,0 ✓ LBA: ≥ 1,0 ✓ Soro ou plasma: ≥ 0,7 e LBA: ≥ 0,8 ▪ PCR (Um dos critérios deve estar presente): <ul style="list-style-type: none"> ✓ Soro, plasma ou sangue total: 2 ou mais testes positivos consecutivos ✓ LBA: 2 ou mais PCR positivos em duplicata ✓ Pelo menos 1 PCR positivo no soro, plasma ou sangue total e 1 PCR positivo em LBA
ASPERGILOSE PULMONAR INVASIVA POSSÍVEL
<ul style="list-style-type: none"> • Presença de critérios do hospedeiro e critérios clínicos e ausência de evidência micológica
COLONIZAÇÃO POR <i>Aspergillus</i> spp.
<ul style="list-style-type: none"> • Nenhum dos critérios de provada e provável infecção atendidos

Legenda: LBA, lavado broncoalveolar. Fonte: Blot et al., 2012; Donnelly et al., 2020.

lamento em cultura, a sorologia para antígenos e a biologia molecular são procedidos a partir de amostras não estéreis (escarro, lavado broncoalveolar, aspirado e escovamento brônquico).⁽²²⁾ O diagnóstico possível, por sua vez, é realizado apenas com base nos fatores do hospedeiro e nos fatores clínicos, tendo em vista a ausência dos fatores micológicos.⁽³⁵⁾

De acordo com esses critérios, especialmente para uma aspergilose provada, hifas septadas hialinas e ramificadas em ângulo agudo e destruição tecidual associada deverão ser observadas, por exame micológico direto e/ou histopatologia, realizados em amostras obtidas de forma asséptica de sítios estéreis clínica e radiologicamente anormais.⁽³⁶⁾ Além disso, deverá ser recuperado o

Aspergillus spp. a partir da cultura dessas amostras clínicas. Provas moleculares (PCR e sequenciamento), se validadas e disponíveis, poderão ser ainda realizadas a partir de tecido formolizado e fixado em parafina.^(22,37)

A aspergilose provável poderá ser considerada quando uma dessas condições relacionadas aos fatores do hospedeiro estiver presente: história recente de neutropenia profunda e por longo tempo (<500 células/mm³ por >10 dias), doença hematológica maligna, transplante alogênico de medula óssea, transplante de órgão sólido, corticoterapia prolongada (≥ 3 mg/kg de corticoides por ≥ 3 semanas em um período de sessenta dias), tratamento com outros imunossupressores de células T (em um período de noventa dias), tratamento com imunossupressores de células B, imunodeficiência aguda e doença aguda enxerto-contrahospedeiro grau III e IV refratárias à corticoterapia.^(22,36) Os aspectos clínicos para aspergilose pulmonar deverão incluir um dos quatro achados em tomografia computadorizada: lesões bem circunscritas e densas com ou sem sinal do halo, sinal do crescente aéreo, cavidades e consolidações lobulares ou segmentares em forma de cunha.^(22,34) As evidências micológicas de aspergilose pulmonar deverão apresentar: detecção microscópica de elementos fúngicos em escarro, lavado broncoalveolar, aspirado ou escovamento brônquico, teste de galactomanana positivo: (soro/ plasma: ≥ 1.0 ; ou lavado broncoalveolar: ≥ 1.0 ; ou soro/ plasma: $\geq 0,7$; e lavado broncoalveolar: $\geq 0,8$; ou líquido cefalorraquidiano: ≥ 1.0) PCR positivo (soro, plasma ou sangue total: 2 ou mais testes consecutivos; ou lavado broncoalveolar: 2 ou mais duplicatas; ou soro, plasma ou sangue total: 1; e lavado broncoalveolar: 1) e isolamento de *Aspergillus* spp. das amostras pulmonares não estéreis.^(22,35)

Apesar dos critérios do Consórcio EORTC/MSG se mostrarem adequados para a aspergilose provável em pacientes imunocomprometidos, tem havido controvérsias quanto à sua aplicação em pacientes imunocompetentes gravemente enfermos, mas não imunocomprometidos, e hospitalizados em UTI, bem como em casos de aspergiloses provável e possível.^(34,35) Dentre alguns motivos, há pacientes que não exibem os fatores do hospedeiro como os recomendados, os achados radiográficos em pacientes com ventilação mecânica podem ser poucos específicos, o que entra em conflito com os critérios da EORTC/MSG, a detecção de galactomanana no soro de pacientes não neutropênicos exibe pouco valor diagnóstico, e as amostras de biópsia de pulmão a céu aberto podem ser contraindicadas em pacientes com insuficiência pulmonar aguda ou com alterações da coagulação. Na realidade, faltam estudos epidemiológicos na população de pacientes imunocompetentes para a definição de fatores de risco para a aquisição de infecção fúngica nesse grupo.⁽³⁶⁾

Em consequência disso, têm sido propostas diversas adaptações conceitualmente convergentes com o in-

tuito de abranger outras situações clínicas não contempladas. Para pacientes de UTI (Critérios AspiCU) com aspergilose pulmonar invasiva, um protocolo derivado do EORTC/MSG, que considera a utilização da cultura positiva de aspirado endotraquial para *Aspergillus* spp. como critério de entrada, além dos fatores do hospedeiro, clínicos e micológicos, para a doença provável (ou putativa), foi validado e considerado adequado. A detecção de *Aspergillus* spp. em culturas de aspirado endotraquial em pacientes em terapia intensiva com ventilação mecânica é da ordem de 2%.⁽³⁷⁾ Tomando-se como referência esse alto percentual, é necessária a diferenciação entre infecção e colonização. Um resultado falso-negativo pode colocar em risco a sobrevivência dos pacientes porque uma aspergilose pulmonar invasiva pode ser letal na ausência de terapia antifúngica. Nesse sentido, é prudente considerar a cultura positiva para *Aspergillus* spp., na ausência de exame direto ou histopatologia, não como colonização, mas sim como falso-positivo, para que um tratamento seja estabelecido. A desvantagem desse algoritmo é requerer uma cultura positiva como critério de entrada, no entanto, não é incomum uma aspergilose pulmonar invasiva cursar na ausência desse achado laboratorial.^(36,37)

Outra proposta trouxe, igualmente, mudanças no critério de aspergilose pulmonar invasiva provável do EORTC/MSG, bem como daqueles Critérios AspiCU.^(22,37) Nessa proposta, conhecida como Critérios de Bulpa, há uma determinação menos estrita na dose/curso da corticoterapia e uma definição menos circunscrita das alterações radiológicas quando comparados com os outros dois critérios, permitindo a inclusão de um maior número de pacientes imunocompetentes na categoria de aspergilose provável. Esse fato é importante porque cerca de 30% a 70% dos pacientes internados em UTI ou sob cuidados intensivos não são gravemente imunocomprometidos, não apresentando, por isso, as condições requeridas para a determinação de doença provável, segundo os critérios do EORTC/MSG.⁽³⁷⁾ Os Critérios de Bulpa sofreram também uma modificação nos fatores micológicos com a introdução da pesquisa de galactomanana em lavado broncoalveolar. Essa alteração foi procedida, pois um resultado positivo no teste de galactomanana surge, em geral, mais precocemente do que a cultura de aspirados endotraqueais (1 dia X 3,8 dias), além de permitir, do mesmo modo, a diferenciação entre colonização e infecção por *Aspergillus* spp.^(22,35)

Não há dúvidas de que a aspergilose pulmonar e das vias aéreas é classicamente uma condição intercorrente a doenças pulmonares de base. Em termos de doença viral, a aspergilose invasiva é uma coinfeção emergente em pacientes com influenza grave que são admitidos em UTI. Aproximadamente 0,1% dos pacientes com influenza requer hospitalização, sendo que, desses, 5%-10% necessitam de cuidados intensivos. Dos pacientes interna-

dos em UTI, cerca de 4% a 20%-25% podem vir a óbito. A aspergilose pulmonar secundária é efetivamente uma das causas de morte, apresentando taxas de mortalidade em noventa dias de até 51%. Esses números revelam o risco a que estão expostos os pacientes com influenza dentro de uma UTI e o potencial de letalidade da doença fúngica.⁽³⁷⁾ A aspergilose pulmonar invasiva é uma condição que está estreitamente associada com os vírus da influenza (influenza A/H1N1 e influenza B) e que, eventualmente, pode apresentar quadros compatíveis com os critérios do Consórcio do EORTC/MSG, *AspICU* e Bulpa. Recentemente, inclusive, um estudo propôs a determinação de critérios baseados nas recomendações do EORTC/MSG e do *AspICU* para o diagnóstico de aspergilose pulmonar invasiva associada à influenza com extensões à COVID-19. Como a compreensão acerca da patogênese para essa virose causada pelo SARS-CoV-2 ainda é limitada, parece aceitável a aproximação de conceitos clínicos e diagnósticos da aspergilose pulmonar invasiva associada à influenza com aquela decorrente de COVID-19⁽³⁵⁻³⁷⁾ (Tabela 2).

No referido estudo, para a definição dos casos de aspergilose pulmonar invasiva associada à influenza foram avaliadas quatro áreas já bem consolidadas, quais sejam, o critério de entrada, os fatores do hospedeiro, os aspectos clínicos e a evidência micológica de infecção. Em relação ao critério de entrada, foi estabelecido como sendo "um paciente que requer admissão em UTI por apresentar distúrbios respiratórios com uma PCR ou uma prova para antígeno positivas para influenza entre o período

de uma semana antes da admissão e/ou 72-96 horas após seu ingresso".⁽³⁵⁾

Os fatores do hospedeiro foram aqueles considerados pelo grupo do EORTC/MSG e do *AspICU*. No entanto, para evitar a ocorrência de falso-positivos em pacientes com baixo risco de infecção fúngica, o que se propugna é o questionamento sobre se a doença está ou não presente, mais do que se o paciente tem ou não uma maior ou menor probabilidade de desenvolvê-la. Por isso, apesar da aspergilose pulmonar associada à influenza apresentar normalmente, pelo menos, uma das condições de base ou terapia com corticosteroides, os fatores do hospedeiro são, em geral, relativizados nessa proposta.^(35,37)

Além do atendimento aos critérios de entrada para a caracterização de doença provada, há a necessidade de evidências micológicas da presença do *Aspergillus* nos tecidos, como observado nas recomendações do EORTC/MSG. Para tanto, biópsias de pulmão podem ser requeridas. Nos casos de traqueobronquites invasivas, uma clínica relacionada à aspergilose pulmonar invasiva associada à influenza, a visualização broncoscópica de elementos hifálicos típicos (hifas septadas hialinas e ramificadas em ângulo de 45 graus) nas pseudomembranas e a identificação morfológica e/ou molecular dos *Aspergillus* spp. isolados em cultura são consideradas critérios de provada aspergilose.^(22,35)

Para a determinação de infecção provável existe também a necessidade de se atender aos critérios de entrada, porém, as evidências de infecção consideradas são

Tabela 2 - Características clínico-laboratoriais entre IAPA e CAPA

Fatores	IAPA	CAPA
Hospedeiro/ Risco	Fatores do hospedeiro negativos pelos critérios do EORTC/MSG [57%] IAPA associada à corticoterapia	Fatores do hospedeiro negativos pelos critérios EORTC/MSG [85%] Aspergilose pulmonar associada à corticoterapia Linfopenia e produção de citocinas derivadas de monócitos Ficolina 1 [FCN1] e macrófagos determinando hiperinflamação
Vírus	Entrada na célula através do ácido salicílico-2,6Gal da camada epitelial do pulmão Imunomodulação por supressão do complexo NADPH oxidase	Entrada na célula através de pneumócitos ACE do Tipo II e células ciliadas Imunomodulação por supressão do complexo NADPH oxidase
Infecção fúngica	Traqueobronquite invasiva em mais da metade dos pacientes (55%) Média de tempo entre admissão na UTI e o diagnóstico: 2-3 dias	Média de tempo entre admissão na UTI e o diagnóstico: 2-3 dias Média de tempo entre admissão na UTI e o diagnóstico: 6 dias
Diagnóstico	Galactomanana em lavado broncoalveolar positiva (88%) Galactomanana em soro positiva (65%)	Galactomanana em lavado broncoalveolar comumente positiva Galactomanana em soro positiva (21%)
Mortalidade em UTI	Influenza com aspergilose (45%) Influenza sem aspergilose (20%)	COVID-19 com aspergilose (17%) COVID-19 sem aspergilose (33%)

Legenda: IAPA, aspergilose pulmonar associada à influenza; CAPA, aspergilose pulmonar associada à COVID-19; EORTC/MSG, Organização Europeia para Investigação e Tratamento do Câncer/ Grupo de Estudos de Micose do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos
Fonte: Werweij et al., 2020.

outras. Uma galactomana sérica positiva (índice $\geq 0,5$) é uma indicação aceitável de aspergilose associada à influenza quando há imagens radiológicas de infiltrados pulmonares ou sinais broncoscópicos de traqueobronquite. É importante ponderar, contudo, que infiltrados pulmonares não são requeridos para o diagnóstico de traqueobronquite. Resultados positivos para galactomana em lavados broncoalveolares ou para culturas de aspirado traqueal na presença de infiltrados pulmonares ou placas endobronquiais são consideradas evidências micológicas que suportam também um diagnóstico provável de infecção pulmonar associada à influenza.^(35,36)

Na prática clínica, deve-se levar em conta que culturas de escarro positivas para *Aspergillus* spp. pode indicar doença pulmonar associada à influenza, todavia, devem-se realizar provas da galactomanana sérica ou em lavados broncoalveolares (índice $\geq 0,1$) ou ainda culturas de aspirados endotraqueais para a confirmação desse achado. É relevante reiterar que resultados discrepantes entre cultura positiva de escarro e teste de galactomanana negativo em lavados broncoalveolares têm baixa probabilidade de ser uma infecção pulmonar associada à influenza. Isolamentos sucessivos de *Aspergillus* spp. de amostras respiratórias podem ser evidências suficientes de doença pulmonar provável quando o paciente se encontrar dentro dos critérios de entrada e houver imagens de infiltrados cavitários. Outra questão refere-se ao não uso da PCR como primeira linha de ferramentas diagnósticas para a categorização em doença provável, devido à sua pouca disponibilidade e ao seu valor preditivo positivo. No entanto, está indicada para a doença provada por favorecer a identificação fúngica em amostras teciduais.^(34,35)

Não obstante suas características particulares, comparações entre influenza e COVID-19 podem contribuir para um melhor entendimento sobre essa coronavirose, principalmente no que tange aos riscos associados.⁽³⁵⁾ Numa primeira análise, apesar de parecer haver uma elevada tendência na COVID-19 para o desenvolvimento de uma doença pulmonar invasiva por *Aspergillus* spp., existem diferenças importantes na patogenicidade, na clínica e no tratamento das doenças causadas pelo SARS-CoV-2 e pelo vírus da influenza. Na doença associada à influenza, há uma grande destruição tecidual, uma imunomodulação pela supressão do complexo enzimático NADPH oxidase e o uso de inibidores da neuraminidase (Oseltamivir) em seu tratamento.^(3,35) O SARS-CoV-2 utiliza um receptor celular diferente daquele que utiliza o vírus da influenza para entrar na célula, normalmente menos encontrado nas vias aéreas. O risco de desenvolvimento de traqueobronquites também é menor na COVID-19. Uma outra questão é o fato de ainda não se conhecer bem a ação direta do SARS-CoV-2 sobre o sistema imunológico, mas, pelo que se observa, não é similar ao vírus da influenza, sugerindo um menor risco de desen-

volvimento de aspergilose invasiva. No caso da influenza, a infecção é aguda e rapidamente fatal, com alta carga fúngica.⁽³⁵⁾ A aspergilose invasiva na COVID-19 não tem mostrado esse padrão. Ao contrário, casos de COVID-19 com e sem infecção fúngica secundária têm apresentado a mesma taxa de mortalidade. Diferentemente dos casos de aspergilose invasiva na influenza, muitos casos de COVID-19 têm sido negativos para galactomanana sérica, levando ao questionamento se há, de fato, uma infecção invasiva ou se ocorre apenas uma colonização com *Aspergillus* na COVID-19.^(22,35,36) A partir desses dados, parece que a COVID-19 não é um risco para o desenvolvimento de infecção invasiva em si mesma e que diferentes fatores relacionados a condições de base específicos e à administração de corticoesteroides podem estar envolvidos.^(35,37)

Outro estudo comparativo objetivou confrontar os métodos de diagnóstico para a infecção por *Aspergillus* spp. associada à influenza com a COVID-19.^(38,39) Por esse estudo, a evidência micológica de *Aspergillus* spp. é dada pela cultura positiva de lavado broncoalveolar ou pelo resultado positivo para galactomanana sérica na ausência de histopatologia. De forma ideal, esses critérios devem combinar imagens de tomografia computadorizada do tórax (nódulos, sinal do halo, cavitações), bem como, eventualmente, outros testes para antígenos aspergiliares ou PCR, permitindo a triagem de influenza e COVID-19.⁽³⁸⁾ Em termos práticos, é importante considerar que a ausência de achados clássicos na tomografia computadorizada não deve ser empregada para excluir a aspergilose pulmonar associada à COVID-19, tendo em vista que, analogamente, imagens típicas de aspergilose invasiva na tomografia podem não existir na doença fúngica associada à influenza. Uma outra questão a considerar é que apesar do teste para galactomanana no lavado broncoalveolar ter uma sensibilidade aceitável tanto na aspergilose pulmonar associada à influenza quanto naquela associada à COVID-19, a utilização de broncoscopia de rotina para a coleta de amostras broncoalveolares em pacientes com COVID-19 tem sido desencorajada pelo risco de produção de aerossóis durante a realização desse procedimento já que pode levar à contaminação dos profissionais de saúde e dos próprios pacientes.⁽⁴⁰⁾ Com o uso da broncoscopia restrito aos indivíduos que tenham cultura nasofaríngea negativa ou limitado a coletas de lavado broncoalveolar que, efetivamente, possam determinar mudanças na estratégia clínica, o teste de galactomanana sérica é tomado em perspectiva. No entanto, a *performance* desse teste parece ser inferior quando empregado para o diagnóstico de COVID-19.⁽³⁸⁾ De maneira semelhante aos achados tomográficos, resultados positivos no teste de galactomanana sérica contribuem para o diagnóstico de COVID-19, mas resultados negativos não podem ser critério de exclusão. O teste de PCR pode ser

útil, entre outras coisas, para a determinação de marcadores clínicos e ambientais de resistência antifúngica. O teste para glucana sérica tem sido considerado também como ferramenta diagnóstica nas infecções fúngicas. O aumento dos níveis de glucana, contudo, pode estar relacionado a diferentes causas não relacionadas à aspergilose. Para aumentar a especificidade e a utilidade desse teste no diagnóstico de COVID-19, uma sequência de provas positivas é requerida.^(38,39)

A complexidade e especificidade do diagnóstico de aspergilose pulmonar associada à COVID-19 tem sido bem relatada.⁽⁴⁰⁾ Está claro que isso decorre do comportamento singular do próprio vírus SARS-CoV-2, que determina im-

portantes diferenças clínico-laboratoriais em relação às infecções pelos vírus da influenza, SARS-CoV e MERS-CoV.^(3,14) Dentre essas diferenças, o emprego de broncoscopia na COVID-19 é crítico. Como discutido anteriormente, em face da recomendação da não utilização dessa técnica na rotina clínica, os pacientes suspeitos de aspergilose pulmonar devem ser, então, submetidos à coleta endotraqueal e/ou a coletas indiretas de lavados broncoalveolares. Para otimizar os procedimentos laboratoriais nessa situação, um algoritmo para triagem e diagnóstico foi desenvolvido, tendo como critérios de entrada a deterioração respiratória e/ou presença de *Aspergillus* spp. no escaro e/ou cultura de aspirado traqueal⁽³⁹⁾ (Figura 1).

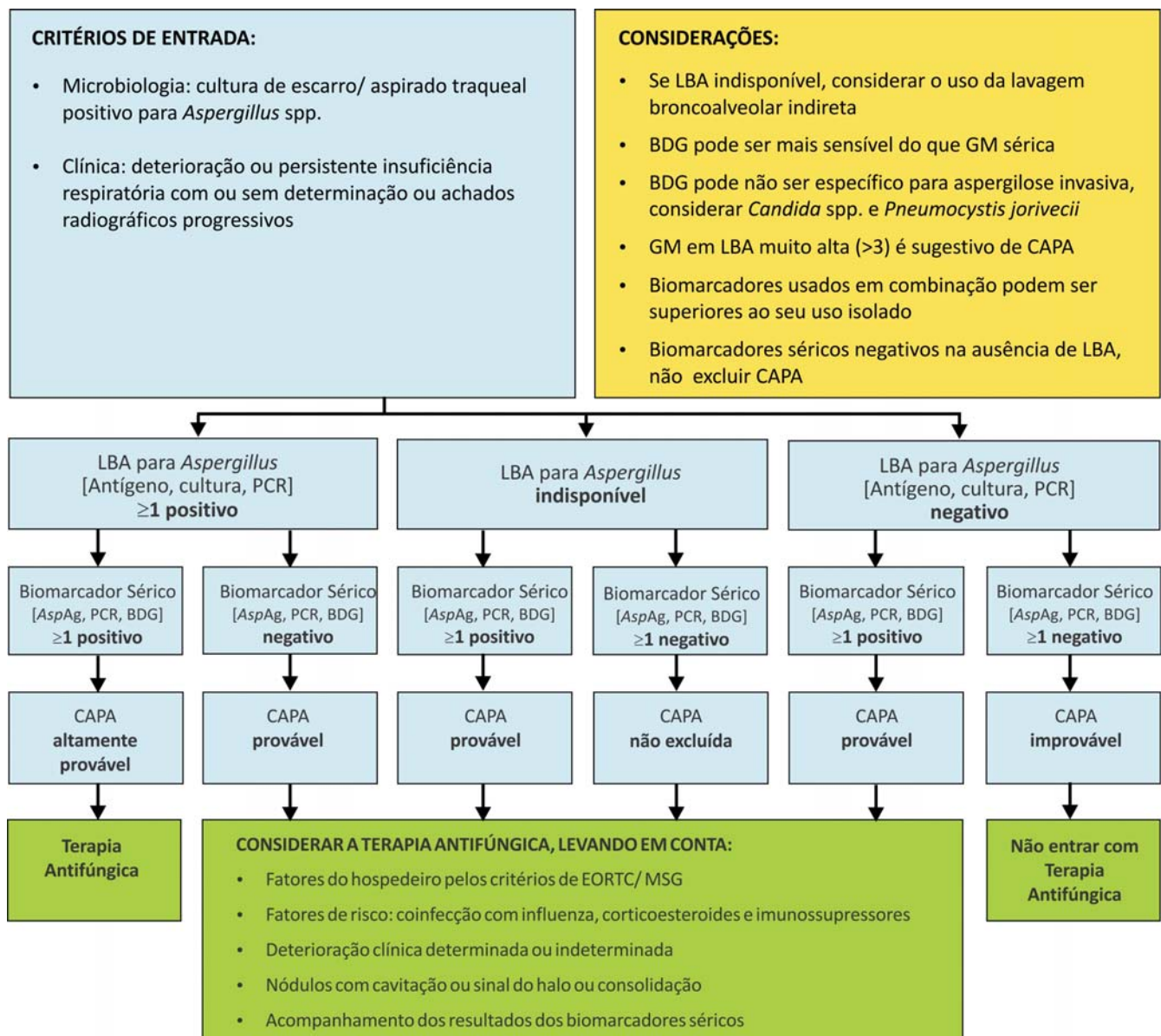


Figura 1. Proposta de algoritmo para triagem e diagnóstico para a COVID-19 associada à aspergilose pulmonar.

Legenda: LBA, lavado broncoalveolar; GM, galactomanana; BDG; 1-3-beta-glucana; AspAg; antígeno aspergilar; IAPA, aspergilose pulmonar associada à Influenza; CAPA, aspergilose pulmonar associada à COVID-19; EORTC/MSG, Organização Europeia para Investigação e Tratamento do Câncer/ Grupo de Estudos de Micoses do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos. Fonte: Armstrong-James et al. 2020.

Mesmo que fatores de risco para o hospedeiro e as características clínicas de aspergilose pulmonar aplicadas à COVID-19 não sejam bem compreendidos, aqueles pacientes que preenchem os critérios de provada e provável infecção devem ser tratados empregando-se os protocolos clássicos de manejo e tratamento.^(41,42) Importa reiterar que, em relação ao tratamento da COVID-19, uma forte correlação entre o uso de imunoduladores para o controle da doença viral aguda e o desenvolvimento de aspergilose invasiva tem sido observada.⁽³⁹⁾

Abstract

The diagnosis of COVID-19-associated pulmonary aspergillosis has proved to be a dilemma in surgical and medical clinic and laboratory medicine. The correct diagnosis is critical because co-infection with Aspergillus in patients with severe COVID-19 pneumonia leads to Acute Respiratory Discomfort Syndrome (SDRA). As specific protocols have not yet been produced for COVID-19, those used for the diagnosis of influenza-associated pulmonary aspergillosis have been adapted with the criteria of the Consortium formed by European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the United States (MSG) and the criteria for patients hospitalized in the ICU (AsplCU). The establishment of definitions for the classification of patients with COVID-19-associated pulmonary aspergillosis to management and treatment represents an important challenge.

Keywords

COVID-19; Influenza; Invasive Aspergillosis; Diagnosis

REFERÊNCIAS

- Gardezi SAH, Ikram A. Application of biosafety principles in Laboratory 1. Palacios Cruz M., Santos E., Velázquez Cervantes M. A., M., León Juárez M. Revista Clínica Española. COVID-19, una emergencia de salud pública mundial.. Available online 20 March 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2020.03.001>.
- Sohrabi C, Alsafi Z, O'Neill N, Khan M, Kerwan A, Al-Jabir A, et al. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). *Int J Surg* 2020 Apr;76: 71-76. doi: 10.1016/j.ijsu.2020.02.034.
- Corroza M, Naranjo L, Romero A, Schmauck T, Veja E. COVID-19 Aspectos biológicos, clínicos y sociológicos: una revisión. *Nullius in verba site*. 2020;1-25.
- Ruiz-Bravo López A, Jiménez Valera M. SARS-CoV-2 y pandemia de síndrome respiratorio agudo (COVID-19). *Ars Pharm*, 61(2): 63-79 (2020). DOI: <http://dx.doi.org/10.30827/ars.v61i2.15177>.
- Mojica-Crespo R, Morales-Crespo MM. Pandemia COVID-19, la nueva emergencia sanitaria de preocupación internacional: una revisión. *Semergen*. 2020 Aug;46 Suppl 1:65-77. doi: 10.1016/j.semarg. 2020.05.010.
- Perez Abreu MR, Gomez Tejeda JJ, Dieguez Guach RA. Características clínico-epidemiológicas de la covid-19. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2020;19(2):1-15.
- Gangneux JP, Bougnoux ME, Dannaoui E, Cornet M, Zahar JRJ. Invasive fungal diseases during COVID-19: We should be prepared. *J Mycol Med*. 2020 Jun;30(2):100971. doi: 10.1016/j.mycmed.2020.100971.
- Hughes S, Troise O, Donaldson H, Mughal N, Moore LSP. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Oct;26(10):1395-1399. doi: 10.1016/j.cmi.2020.06.025.
- Nori P, Cowman K, Chen V, Bartash R, Szymczak W, Madaline T, et al. Bacterial and fungal coinfections in COVID-19 patients hospitalized during the New York City pandemic surge. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020 Jul 24:1-5. doi: 10.1017/ice.2020.368
- Vanderbeke L, Spriet I, Breyneart C, Rijnders BJA, Verweij PE, Wauters J. Invasive pulmonary aspergillosis complicating severe influenza: epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis*. 2018 Dec;31(6):471-480. doi: 10.1097/QCO.0000000000000504.
- Wang HJ, Ding YG, Xu J, Li X, Li XF, Yang L, et al. Death of a SARS case from secondary aspergillus infection. *Chin Med J (Engl)* 2004;117(8):1278-80.
- Zhu X, Ge Y, Wu T, Zhao K, Chen Y, Wu B, et al. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Res*. 2020; 285:198005. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198005.
- Clancy CJ, Nguyen MH. COVID-19, superinfections and antimicrobial development: What can we expect? *Clin Infect Dis*. 2020 May 1:ciaa524. doi: 10.1093/cid/ciaa524.
- Chen X, Liao B, Cheng L, Peng X, Xu X, Li Y, et al. The microbial coinfection in COVID-19. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Sep;104(18):7777-7785. doi: 10.1007/s00253-020-10814-6. Epub 2020 Aug 11.
- Lv Z, Cheng S, Le J, Huang J, Feng L, Zhang B, Li Y. Clinical characteristics and co-infections of 354 hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Microbes Infect*. 2020 May-Jun;22(4-5):195-199. doi: 10.1016/j.micinf. 2020.05.007.
- García-Vidal C, Sanjuan G, Moreno-García E, Puerta-Alcalde P, García-Pouton N, Chumbita M, et al. Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. COVID-19 Researchers Group. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Jul 31:S1198-743X(20)30450-X. doi: 10.1016/j.cmi.2020.07.041. Online.
- Zuo T, Zhan H, Zhang F, Liu Q, Tso EYK, Lui GCY, et al. Alterations in Fecal Fungal Microbiome of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization until Discharge. *Gastroenterology*. 2020 Oct;159(4):1302-1310.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2020.06.048
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012 Dec 19;4(165):165rv13. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404.
- Ahamefula Osibe D, Lei S, Wang B, Jin C, Fang W. Cell wall polysaccharides from pathogenic fungi for diagnosis of fungal infectious disease. *Mycoses*. 2020;63(7):644-652. doi: 10.1111/myc.13101.
- Cole DC, Govender NP, Chakrabarti A, Sacarlal J, Denning DW. Improvement of fungal disease identification and management: combined health systems and public health approaches. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(12):e412-e419. doi: 10.1016/S1473-3099(17) 30308-0.
- Choi SH, Kim T, Park KH, Kwak YG, Chung JW, Lee MS. Early administration of neuraminidase inhibitors in adult patients hospitalized for influenza does not benefit survival: a retrospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Sep;36(9):1673-1677. doi: 10.1007/s10096-017-2982-z.
- Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;12; 71(6):1367-1376. doi: 10.1093/cid/ciz1008.
- Gao Y, Soubani A. Advances in the diagnosis and management of pulmonary aspergillosis. *Adv Respir Med*. 2019;87(6):231-243. doi: 10.5603/ARM.2019.0061.
- Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015;70(3):270-7. doi: 10.1136/thoraxjnl-2014-206291.
- Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011;20(121):156-74. doi: 10.1183/09059180.00001011.

26. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(4):201–208. <https://doi.org/10.1016/j.>
27. Cuervo-Maldonado SI, Gómez-Rincón JC, Rivas P. Actualización en Aspergilosis con énfasis en Aspergilosis invasora. *Infectio*. 2010;14(S2):S131-S144. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70131-4](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70131-4).
28. Oxilia HG, Oxilia RG, Morales LF, Falco F. Aspergilosis: una patología a considerar *Rev. argent. Radiol*. 2008;72(1): 55-60.
29. Olaechea Astigarraga PM, Álvarez Lermab F, Zaldibar Enriqueza EZ. Invasive pulmonary aspergillosis in the non-neutropenic critical patient: future challenges. *Med Intensiva*. 2006 Nov;30(8):386-91. Spanish. doi: 10.1016/s0210-5691(06)74553-3. [Article in Spanish].
30. Fernández LK, Charterina SA, Alcalá-Galiano Rubio A, Sánchez Nistal MA. Las diferentes manifestaciones de la aspergilosis pulmonar. Hallazgos en tomografía computarizada Multidetector. The different manifestations of pulmonary aspergillosis. *Radiología*. 2014;56(6): 96-504. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2013.09.007>.
31. Kozel TR, Wickes B. Fungal diagnostics. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Apr 1;4(4):a019299. doi: 10.1101/cshperspect.a019299.
32. Alanio A, Delliere S, Fodil S, Bretagne S, Megarbane B. High prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill COVID-19 patients. *MedRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.21.20064915>.
33. Vélez JD, Rosso-Suárez F. Protocolo de estudio y manejo de pacientes con aspergilosis. *Infectio*. 2012;46(Supl. 3):114-117.
34. Rieger H, Lustig D, Barlow S, Ostermann H, Fiegl M, Peterson L, Rieger CT. Applicability of the EORTC/MSG criteria for IFD in clinical practice. *Ann Hematol*. 2015 May;94(5):847-55. doi: 10.1007/s00277-014-2282-y. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25544029.
35. Verweij PE, Rijnders BJA, Brüggemann RJM, Azoulay E, Bassetti M, Blot S, et al. Review of influenza-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients and proposal for a case definition: an expert opinion. *Intensive Care Med*. 2020;46(8):1524-1535. doi: 10.1007/s00134-020-06091-6.
36. Huang L, He H, Jin J, Zhan Q. Is Bulpa criteria suitable for the diagnosis of probable invasive pulmonary Aspergillosis in critically ill patients with chronic obstructive pulmonary disease? A comparative study with EORTC/ MSG and ICU criteria. *BMC Infectious Diseases*. 2017;17: 209. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2307-y>
37. Blot SI, Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, Meersseman W, Brusselaers N, et al; AspICU Study Investigators. A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(1): 56-64. doi: 10.1164/rccm.201111-1978OC.
38. Schauwvlieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N, Verwijs R, Vanderbeke L, Van Tienen C, et al; Dutch-Belgian Mycosis study group. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2018 Oct;6(10):782-792. doi: 10.1016/S2213-2600(18)30274-12600(18)30274-1.
39. Armstrong-James D, Youngs J, Bicanic T, Abdolrasouli A, Denning DW, Johnson E, et al. Confronting and mitigating the risk of COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J*. 2020 Oct 1;56(4):2002554. doi: 10.1183/13993003.02554-2020.
40. Verweij PE, Gangneux JP, Bassetti M, Brüggemann RJM, Cornely OA, Koehler P, et al; European Confederation of Medical Mycology; International Society for Human and Animal Mycology; European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group; ESCMID Study Group for Infections in Critically Ill Patients. Diagnosing COVID-19-Associated pulmonary aspergillosis. *Lancet Microbe*. 2020 Jun;1(2): e53-e55. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30027-6. Erratum in: *Lancet Microbe*. 2020 Jul;1(3):e108.
41. Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016; 15;63(4):e1-e60. doi: 10.1093/cid/ciw326.
42. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24 (Suppl. 1): e1-e38. doi: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.

Correspondência

Paulo Murillo Neufeld

Faculdade de Farmácia-UFRJ

Prédio do CCS, Bloco A2, Sala 029

21940-590 – Rio de Janeiro-RJ, Brasil

pmneufeld@yahoo.com.br

A arquitetura laboratorial e a proteção dos profissionais de saúde em tempos de COVID-19

Laboratory architecture and protection of health professionals in COVID-19 times

Sandra Novellino Sancanari¹

Joseli Maria da Rocha Nogueira²

Resumo

O novo Coronavírus, causador da COVID-19, que vem atingindo o planeta desde dezembro de 2019, tem colocado todo o meio científico preocupado com a segurança da população e dos profissionais da saúde. Essa preocupação deflagrou a busca acelerada para criar formas de diagnosticar, tratar e prevenir esta doença, controlando de alguma forma o vírus SARS-CoV-2. Várias indústrias particulares e órgãos governamentais estão investigando as tecnologias adequadas para minimizar e se possível acabar com essa pandemia. Testes e medicamentos variados estão sendo pesquisados e produzidos em várias partes do mundo, e há um forte estímulo mundial para que a primeira vacina possa ser produzida de forma o mais segura possível e dentro dos parâmetros indicados pela OMS (Organização Mundial de Saúde). Todavia, esses próprios profissionais devem estar seguros em seus ambientes de trabalho para poderem realizar suas pesquisas. Neste contexto, estudos associados à biossegurança e à arquitetura nos auxiliam fornecendo as diretrizes das condições ideais para definição do espaço físico e equipamentos adequados para a manipulação deste vírus dentro do grupo de risco em que o mesmo se insere. Para os diversos modelos de trabalho, desde a coleta às diferentes formas de diagnóstico, e mesmo nas pesquisas com o SARS-CoV-2, a manipulação só deverá acontecer em laboratórios cuja arquitetura e os equipamentos disponíveis possibilitem a proteção biológica adequada, e o nível de contenção irá variar de acordo com a finalidade da atividade. Este artigo objetiva auxiliar na definição das características necessárias aos laboratórios indicados para esses diferentes tipos de trabalho, em atendimento às normas de biossegurança/arquitetura, não só quanto à manipulação do vírus, mas do cuidado em relação aos profissionais e à população exposta a essa pandemia bem como os principais itens no ambiente físico dos laboratórios. A metodologia utilizada para esse artigo foi uma busca em diferentes fontes nacionais e internacionais, já que se trata de uma revisão narrativa para responder uma pergunta específica associada ao tipo de laboratório e seus equipamentos de proteção para cada uma das atividades de trabalho com o SARS-CoV-2. Considerando as contenções necessárias e as recomendações dos órgãos competentes, a arquitetura é um assunto que não deve ser negligenciado quando pensamos em instalações adequadas para trabalhos diversos com esse tipo de agente. Seguindo as normas de biossegurança e o bom senso, é possível minimizar o risco do profissional de saúde que trabalha dentro e fora do laboratório de microbiologia evitando comprometer a sua saúde e prevenindo a contaminação ambiental.

Palavras-chave

Coronavirus; SARS-CoV-2; arquitetura laboratorial; biossegurança

INTRODUÇÃO

Como tem sido amplamente divulgado, a origem da pandemia atual ocorreu na província de Hubei, capital Wuhan, na China, em um grande mercado de frutos do mar e animais vivos, no final do ano de 2019. Evidências científicas indicaram que um novo Coronavírus (SARS-COVID-19) de possível origem zoonótica foi detectado, infectando diretamente as pessoas trabalhadoras do local.⁽¹⁾ Atualmente

te já se sabe que a transmissão deste vírus ocorre de pessoa para pessoa ou, em menor grau, por contato direto ou indireto como fômites.⁽²⁾

A velocidade com que esse vírus se propagou e sua transmissão aérea fez com que sua classificação de risco aumentasse sobremaneira, pois, apesar de não ter alto grau de mortalidade, sua taxa de dispersão tem sido alarmante, tornando a COVID-19 uma pandemia global em poucos meses e um risco para a vida de muitas pessoas. O significa-

¹Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

²Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP). Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 31/08/2020

Artigo aprovado em 11/09/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200004

do etimológico da palavra biossegurança, refere-se a raiz grega "bio", significando vida, e segurança que propicia ao ser humano estar seguro, livre de perigos. Para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), representa um "conjunto de medidas e procedimentos técnicos necessários para a manipulação de agentes e materiais biológicos, capaz de prevenir, reduzir, controlar ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal e vegetal, bem como o meio ambiente".⁽³⁾ Em contexto mais amplo, representa um conjunto de medidas que visam não só a segurança dos profissionais e dos demais grupos envolvidos, evitando acidentes microbiológicos, físicos, químicos e para o meio ambiente, mas também a redução e o controle de riscos nos processos biotecnológicos, nas áreas da biologia e da saúde.⁽⁴⁾

A Lei de Biossegurança nº 11.105, criada em 24 de Março de 2005, teve como prioridade regulamentar os critérios e estabelecer normas de segurança e mecanismos de fiscalização associados às atividades que envolvem organismos geneticamente modificados (OGM), criar o Conselho Nacional de Biossegurança, reestruturar a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança e dispor sobre a Política Nacional de Biossegurança.⁽⁵⁾ Surgem então várias Instruções Normativas, e entre elas a de nº 7, de 06 junho de 1997,⁽⁶⁾ que apresenta em seu anexo a classificação de agentes etiológicos humanos e animais, agrupando os microrganismos em classes de 1 a 4, de menor a maior risco biológico.⁽⁷⁾ Essa determinação levou em conta vários fatores quanto à periculosidade dos microrganismos manipulados, inclusive considerando os procedimentos laboratoriais adequados para o seu manejo. Assim, o risco acabou apontando para a necessidade do tipo de controle que seria utilizado e consequentemente definiu os níveis de biossegurança de cada laboratório, considerando, é claro, a adequação do ambiente arquitetônico e a utilização dos equipamentos para os experimentos necessários, tais como cabines de segurança, os equipamentos de proteção individual e os de proteção coletiva.

Segundo as classificações de risco biológico sugeridas pela Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz),⁽⁷⁾ pelo Centro de Biossegurança Canadense⁽¹⁾ e pelo *Center of Disease Control* (CDC - EUA),⁽⁸⁾ este vírus foi designado como pertencente à Classe 3, conforme descrição das características "alto risco individual e moderado risco para a comunidade; agentes biológicos que possuem transmissão por via respiratória, causando patologias letais e as medidas terapêuticas são ainda indefinidas; exemplo: Coronavírus (COVID-19)/ SARS-CoV-2".

É importante não confundir o risco biológico de um agente com o nível de biossegurança de um laboratório onde ele pode ser manipulado. O nível de biossegurança

aplicado para os laboratórios obedece o grau de contenção para o trabalho com os agentes biológicos com boas práticas e técnicas dos profissionais envolvidos, equipamentos de segurança e instalações laboratoriais adequadas.⁽⁹⁾

A contenção primária está associada às boas técnicas microbiológicas e uso do equipamento de segurança adequado, como as cabines de segurança biológica. Já a contenção secundária, ligada também à parte de biossegurança do meio ambiente externo ao laboratório, é proporcionada por uma combinação de um projeto adequado de instalações e das práticas operacionais,⁽¹⁰⁾ ou seja, o nível do laboratório necessário estará diretamente ligado ao tipo de atividade que será realizada naquele local. Todavia, o que define o nível é a proteção que ele fornece.

São divididos em 04 (quatro) níveis, do menor para o maior grau de contenção e complexidade nas práticas e técnicas de laboratório e suas barreiras primárias e secundárias⁽⁷⁾

1. NB-1: laboratório com nível básico de biossegurança, sem barreiras primárias ou secundárias, muito utilizado em treinamento educacional de técnicas de laboratório;

2. NB-2: laboratório utilizado para manipulação de agentes de risco moderado, presentes na população e que estejam interligados a uma patologia humana de risco variável. Sua produção de aerossóis e borrifos é pequena e os microrganismos podem ser manipulados em bancadas, mas para qualquer outro procedimento que ofereça risco de exposição dos profissionais devem ser utilizados equipamentos de contenção primária ou cabine de segurança biológica;

3. NB-3: laboratórios utilizados para manipulação de agentes nativos que possuam um potencial de transmissão por via respiratória e que possam causar infecções sérias e fatais. São necessárias barreiras primárias e secundárias para proteção dos profissionais, do ambiente e da população contra a exposição aos aerossóis altamente infecciosos. Todas as manipulações destes agentes deverão ser feitas em cabines de segurança biológica;

4. NB-4: laboratórios utilizados para manipulação de agentes exóticos perigosos que apresentam um alto risco por provocarem doenças fatais aos seres humanos; podem ser transmitidos via aerossóis e até o presente momento não existem vacinas ou profilaxia adequadas.⁽⁹⁾

Para a manipulação do Coronavírus (COVID-19)/ SARS-CoV-2, os laboratórios deverão realizar uma avaliação de risco visando a segurança dos testes laboratoriais, dos profissionais, do ambiente com medidas de controle adequadas, cumprindo as práticas de biossegurança laboratorial necessárias. Para determinados processos de manuseio de materiais com infecção suspeita

de COVID-19, hematologia de gases sanguíneos, testes de amplificação de ácido nucleico (NAAT), deverão ser utilizados no mínimo laboratórios NB-2, segundo indicado pelo Manual de Biossegurança Laboratorial da OMS.⁽¹¹⁾

Os procedimentos técnicos deverão ser realizados para minimizar a geração de aerossóis e gotículas, principalmente no que se refere aos materiais infecciosos, como, por exemplo, interrupção sônica, realizados de forma adequada em cabines de segurança biológica (CSB) validada ou contenção primária, por profissionais qualificados.⁽¹¹⁾

Os equipamentos de proteção individual (EPI's) são regulamentados pela portaria nº 32/4, Norma Regulamentadora - NR 6, do Ministério do Trabalho, de 08 de junho de 1978, e são considerados dentro desse preceito como "todo dispositivo ou produto, de uso individual utilizado pelo trabalhador, destinado à proteção de riscos suscetíveis de ameaçar a segurança e a saúde no trabalho".⁽¹²⁾

Os EPI's deverão atender ao tipo de laboratório, portanto, segundo informações disponibilizadas pela Fiocruz, para NB-2 devem-se, como barreira, utilizar máscaras de proteção, protetor facial ou óculos de proteção, para prevenção contra os aerossóis provenientes da manipulação de microrganismos fora da cabine de segurança biológica. O uso de uniformes de proteção (jalecos, gorros) deve ocorrer somente dentro dos laboratórios. O uso de luvas é recomendado quando houver contato direto com os materiais infecciosos ou equipamentos contaminados; luvas descartáveis não poderão ser reutilizadas e não poderão ser utilizadas fora do ambiente laboratorial.⁽⁷⁾

Os equipamentos de proteção individual (EPI's) serão adequados conforme uma detalhada avaliação de risco, para uso dos profissionais envolvidos na manipulação do vírus. Será importante o uso de desinfetantes adequados com atividade comprovada contra o vírus envelopado, tais como hipoclorito, álcool, peróxido de hidrogênio, compostos de amônio quaternário e compostos fenólicos.⁽¹³⁾

Os equipamentos de proteção coletiva (EPC's) têm a finalidade de proteger a saúde e a integridade física dos profissionais envolvidos e da coletividade. É regimentada pela NR-4, Serviços Especializados em Engenharia de Segurança e em Medicina do Trabalho, de 08 de junho de 1978⁽¹⁴⁾ e pela NR-9, Programa de Prevenção de Riscos Ambientais,⁽¹⁵⁾ da mesma data.

Os EPC's mais utilizados em NB-2 para atendimento ao vírus SARS-CoV-2 são as câmaras de segurança biológica de classe I e II (CSB) (para grupos de Risco 1-3) para a manipulação de material infeccioso, vírus ou que possam produzir aerossóis ou derramamento,⁽¹⁶⁾ a autoclave, utilizada para a descontaminação dos materiais utilizados nos procedimentos e dos resíduos gerados para sua reutilização ou descarte⁽¹⁷⁾ e os chuveiros de emergência e lava-olhos.

As CSBs, classe II, possuem filtros Hepa para filtração do ar de exaustão que pode recircular na parte interna do laboratório, sendo necessário que a CSB esteja com a certificação anual em dia. Devem ser indicadas no "lay-out" do projeto arquitetônico, distante das circulações e fora das correntes de ar de portas, janelas e sistemas de ar condicionado.⁽¹⁷⁾

Na elaboração da instalação de um espaço físico para um laboratório de nível de biossegurança NB-2 ou NB-3, visando à manipulação do vírus SARS-CoV-2, é fundamental a avaliação de riscos que envolvem as condutas exigidas no manuseio do vírus no laboratório, as contenções primárias e secundárias e a descrição dos equipamentos utilizados nestes ambientes.

É importante frisar que um projeto arquitetônico deve atender a todas as prerrogativas ideais para as boas práticas laboratoriais, sendo necessária a elaboração de um programa de necessidades que envolva os profissionais da área de engenharia/arquitetura e os profissionais/técnicos do laboratório, onde serão indicados todos os processos internos, suas etapas, os equipamentos laboratoriais necessários, mobiliários e os fluxos de trabalho.⁽¹⁸⁾

Para os laboratórios NB-2 são definidos os ambientes tais como um laboratório principal com outro de apoio para descontaminação, lavagem, preparo e esterilização dos materiais, áreas de apoio e administrativa. Dentre as áreas de apoio podemos indicar copas, vestiários, sanitários, depósitos, almoxarifados e DML (depósitos para materiais de limpeza); para as áreas administrativas, secretaria, sala de estudos e escritórios.⁽¹⁸⁾

Na elaboração de um laboratório NB-3, todos os espaços físicos indicados no NB-2 servem de apoio logístico ao NB-3. Para acesso ao laboratório NB-3 indica-se construir antecâmaras para assepsia e paramentação dos profissionais envolvidos e a especificação de autoclave dupla porta e guichês de passagem para esterilização e descontaminação do material patogênico.⁽¹⁸⁾

Segundo as normas brasileiras definidas pelo Ministério da Saúde, na parte de arquitetura, as instalações físicas dos laboratórios NB-2 deverão possuir portas com controle de acesso ao público, manter-se fechadas e possuir visores. Sua largura mínima é de 1,10 m; o símbolo de "Risco Biológico" deverá estar afixado com o agente manipulado, os dados do pesquisador, EPI necessário e procedimentos para a saída do ambiente.⁽¹⁷⁾

As janelas e portas devem ser revestidas de materiais que retardem o fogo e com facilidade de higienização; as janelas deverão ter proteção contra os insetos e vidros com película protetora contra os raios solares. Deve haver identificação das rotas de fuga e das saídas de emergência com direção para as áreas externas da edificação, com barras antipânico. Além disso, os mobiliários dos la-

boratórios devem ser lisos e sem reentrâncias para facilitar a manutenção e limpeza e as cadeiras de material que permita a descontaminação, assim como as superfícies das bancadas, que devem ser revestidas de material impermeável, liso e resistente ao calor moderado e aos solventes químicos e ter largura ideal de aproximadamente 90 cm para apoio dos equipamentos. Seguindo esse raciocínio, os revestimentos de piso, paredes e tetos devem ser impermeáveis, lisos, para facilitar a higienização, e resistentes aos produtos químicos e de preferência com cores claras. Além disso, o pé direito do laboratório deve possuir no mínimo 3,00 m.⁽¹⁷⁾

As instalações elétricas (iluminação e tomadas) e as instalações de climatização deverão ser projetadas e executadas conforme normas vigentes, seguidas das instalações hidrossanitárias, que devem atender à demanda dos equipamentos laboratoriais, tanto para o atendimento ao sistema de água fria e de combate a incêndio quanto para o sistema de esgotamento sanitário.⁽⁴⁾

Cada laboratório deve possuir um lavatório (para lavagem das mãos), chuveiro de emergência e lava-olhos e um local no interior do laboratório, próximo ao acesso, para guarda dos jalecos e dos EPI's, e um local externo para a função de vestiário.⁽¹⁷⁾

Devem contar com abrigos externos adequados e ventilados para estocagem de substâncias e materiais, um para abrigo dos cilindros de gases e um abrigo isolado para os resíduos sólidos.⁽¹⁵⁾

É importante salientar que quando as manipulações laboratoriais do vírus SARS-CoV-2 ocorrerem pela cultura do vírus, ensaios de isolamento ou neutralização, estas deverão ser realizadas em laboratórios NB-3 de contenção com fluxo de ar direcional interno.⁽¹³⁾

Nestes recintos deverão estar presentes somente os profissionais competentes e treinados para atendimento às práticas e requisitos necessários do NB-3, inclusive a utilização dos equipamentos de proteção individual (EPI's), já que nesse laboratório torna-se obrigatório o uso de roupas de proteção sem aberturas frontais, as quais devem ser esterilizadas para o descarte ou lavagem. Além disso, quando houver contato direto com os materiais infecciosos ou equipamentos contaminados, deverá ser avaliada a possibilidade do uso de dois pares de luvas, principalmente quando a manipulação não ocorrer nas cabines de segurança biológica. Nesses casos também devem ser utilizados respiradores ou protetores faciais com dispositivo de contenção física.⁽⁷⁾

Os EPCs mais utilizados em NB-3 para atendimento ao vírus SARS-CoV-2 são as câmaras de segurança biológica de classe II ou III, autoclave com porta dupla, utilizada para a descontaminação dos materiais utilizados nos procedimentos e dos resíduos gerados para sua reutilização ou descarte.⁽¹⁸⁾

As CSB da classe II, da qual existem 4 tipos (A1, A2, B1 e B2), só permitem o fluxo de ar esterilizado (filtro HEPA) sobre a superfície de trabalho. Já as CBS, classe III, o ar fornecido é filtrado (filtro HEPA) e o ar expelido passa por dois filtros (HEPA). A definição de qual câmara será utilizada vai depender da atividade que nela será realizada e dos EPI's que podem estar disponíveis no Laboratório.⁽¹⁸⁾

Além dos itens indicados aos laboratórios NB-2, as instalações físicas dos laboratórios NB-3 deverão possuir uma separação das áreas de trânsito irrestrito do prédio e possuir acesso restrito. Suas janelas deverão ser lacradas e fechadas⁽¹⁰⁾ e deve haver uma câmara pressurizada/ antecâmara ou vestiário de barreira para a entrada e saída dos técnicos, para colocação ou retirada dos EPI's, com sistema de bloqueio de dupla porta, fechamento automático e intertravamento.⁽¹⁷⁾

Nesse nível de segurança, na área de descontaminação de resíduos provenientes das manipulações, deverá ser instalado uma autoclave com dupla porta (biocontenção). Além disso é obrigatório um lavatório, chuveiro de emergência e lava-olhos com acionamento automático ou acionado com cotovelo ou pé na saída do laboratório.⁽¹⁰⁾

Todas as instalações elétricas e hidráulicas devem ter seus comandos fora da área de contenção do laboratório e devem ser independentes de outras edificações. O perímetro de contenção do laboratório também deve ser dotado de sistema que permita sua vedação para procedimentos de descontaminação dos ambientes, sendo necessário haver saída de emergência do laboratório de acordo com as normas vigentes.⁽¹⁷⁾

Considerando a complexidade arquitetônica e capacidade de contenção dos laboratórios disponíveis para o enfrentamento da atual pandemia, o Ministério da Saúde definiu que agentes com potencial de risco zoonótico não existentes no Brasil, exóticos, e de alto risco de disseminação no meio ambiente devem ser manipulados em laboratórios com o maior nível de contenção existente no País, que, no caso do Brasil, são os Laboratórios NB-3. Fica claro que todas as atividades desde a cultura até as mais simples poderão ser realizadas no NB-3, contudo ficam permitidas no NB-2 as atividades de risco moderado em que não houver necessidade de contenção NB-3, como testes de diagnóstico em espécimes de soro ou sangue, manipulação de vírus lisados, fixados, partes do genoma não infecciosos e empacotamento de espécimes clínicos para diagnóstico.⁽¹⁹⁾

CONCLUSÃO

A necessidade de se trabalhar rapidamente com esse agente de forma segura tem levado muitos laboratórios a iniciarem seus trabalhos adaptando seus espaços à nova realidade. Além disso, vários novos espaços tiveram que

ser construídos em tempo recorde, e, considerando o custo de instalação de todos os equipamentos, não tem sido uma tarefa simples.

O importante no momento é considerar a segurança do trabalhador, da qualidade dos testes realizados e a manutenção da condição ambiental no entorno.

Um laboratório que segue padrões de arquitetura voltados para a área da saúde já reúne a maioria dos itens necessários para a configuração de espaços com Nível de Biossegurança 2 (NB2), com o uso de materiais, acabamentos e sistemas imprescindíveis para que as rotinas aconteçam em segurança seguindo esses quesitos. O *layout* dos espaços estabelece áreas de controle e de utilização com restrições, conforme preconizam os protocolos de áreas limpas, indispensáveis em ambientes de pesquisa. Todavia, para laboratórios NB-3 já considerados de contenção são requeridas outras especificações mais restritivas, que possivelmente somente locais que já trabalhavam com cultura de agentes de nível de risco 3 ou áreas de produção de vacinas possuem. É então importantíssimo que haja um estímulo para que novos laboratórios sejam construídos, e as recomendações dos projetos arquitetônicos, dentro destes parâmetros, não devem ser negligenciadas, pois só com instalações adequadas poderemos ampliar a possibilidade de trabalho com maior nível de segurança, na busca de respostas para minimizar e, se possível, acabar com essa pandemia.

Abstract

The new Coronavirus, which causes the disease COVID-19, and which has been affecting the planet since December 2019, has put the entire scientific community concerned with the safety of the population and health professionals. This concern started the accelerated search to create ways to diagnose, treat and prevent this disease, somehow controlling the SARS-CoV2 virus. Several private industries and government agencies are investigating the appropriate technologies to minimize and, if possible, end this pandemic. Varied tests and drugs are being researched and produced in various parts of the world, and there is a strong worldwide stimulus for the first vaccine to be produced as safely as possible and within the parameters indicated by WHO (World Health Organization). However, these professionals must be safe in their work environments in order to carry out their research. In this context, studies associated with biosafety and architecture help us by providing guidelines for the ideal conditions for the manipulation of this virus, within the risk group to which it belongs. For the various working models, from collection, to different forms of diagnosis and even in research with the virus, manipulation should only take place in laboratories whose architecture and the available equipment enable adequate biological protection, and the level of containment will vary according to the purpose of the activity. This article aims to assist in defining the characteristics necessary for the laboratories indicated for these different types of work, in compliance with biosafety / architecture standards, not only regarding the manipulation of the virus, but also the care in relation to professionals and the population exposed to this pandemic as well as the main items in the physical environment of the laboratories. The methodology used for this article was a search in different national and international sources, since it is a narrative review to answer a specific question associated with the type of laboratory and its protective equipment for each of the work activities with SARS-CoV-2.

Considering the necessary restraints and the recommendations of the competent organizations, architecture is a subject that should not be neglected when we think of suitable facilities for diverse work with this type of agent, following the rules of biosafety and common sense, it is possible to minimize the risk the health professional who works inside and outside the microbiology laboratory, avoiding compromising his health and preventing environmental contamination.

Keywords

Coronavirus; SARS-CoV-2; laboratory architecture; biosafety

REFERÊNCIAS

1. Canadá. SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/biosafety-directives-advisories-notifications/novel-coronavirus-january-27.html> (acesso em 12 ago 2020).
2. Ministério da Saúde. Coronavírus (COVID 19). <https://coronavirus.saude.gov.br/sobre-a-doenca#o-que-e-covid> (acesso em 10 ago 2020).
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Biossegurança e Gerenciamento de Resíduos - Atualizações. Brasília: Ministério da Saúde; 2019.
4. Manual de Biossegurança - Parte III - Laboratórios. Governo da Bahia: Secretaria de Saúde; 2001.
5. Brasil. Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados - OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança - CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança - PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Diário Oficial da União - 28 mar 2005; seção 1.
6. Brasil. Instrução Normativa CTNBio nº 7, de 06 de junho de 1997. Dispõe sobre as normas para o trabalho em contenção com organismos geneticamente modificados - OGMs.
7. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Níveis de Biossegurança. http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/niveis_de_biosseguranca.html (acesso em 12 ago 2020).
8. CDC Centers for Disease Control and Prevention. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html#isolation> (acesso em 12 ago 2020).
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Noções Gerais para Boa Prática em Microbiologia Clínica. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.
10. Fundação Nacional de Saúde (Funasa). Biossegurança em Laboratórios Biomédicos de Microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde; 2000.
11. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV) Interim guidance 12 February 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2 (acesso em 10 ago 2020).
12. Brasil. Norma Regulamentadora Ministério do Trabalho nº 6, de 08 e junho de 1978. Equipamento de Proteção Individual.
13. Bureau Biosecurity. Biosafety and biosecurity aspects of SARS-CoV-2. <https://www.bureaubiosecurity.nl/en/news/biosafety-and-biosecurity-aspects-of-sars-cov-2> (acesso em 14 ago 2020).
14. Brasil. Norma Regulamentadora Ministério do Trabalho nº 4, de 08 de junho de 1978. Serviços Especializados em Engenharia de Segurança e em Medicina do Trabalho.

15. Brasil. Norma Regulamentadora Ministério do Trabalho nº 9, de 08 de junho de 1978. Programa de Prevenção de Riscos Ambientais.
16. Sangioni LA, Pereira DIB, Vogel FSF, Botton SA. Princípios de biossegurança aplicados aos laboratórios de ensino universitário de microbiologia e parasitologia. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.1, p.91-99, jan, 2013 ISSN 0103-8478. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012005000122>.
17. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com agentes biológicos. 2ª ed. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
18. Pessoa, MCTR, Ramos RCCL, Vieira VM. Biossegurança e Arquitetura para Laboratórios. In: Costa MAF, Costa MFB. Biossegurança Geral (para cursos técnicos da área de saúde). Rio de Janeiro: Publit; 2009. p. 99-123.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.349, de 14 de setembro de 2017. Aprova a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos elaborada em 2017, pela Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS), do Ministério da Saúde. https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prt2349_22_09_2017.html (acesso em 31 ago 2020).

Correspondência

Joseli Maria da Rocha Nogueira
Departamento de Ciências Biológicas
Escola Nacional de Saúde Pública
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Manguinhos
Rio de Janeiro-RJ, Brasil
joseli@ensp.fiocruz.br

Impacto do microbioma na COVID-19

Impact of the microbiome on COVID-19

Alessandro Conrado de Oliveira Silveira

Resumo

Inúmeros estudos demonstram o papel da microbiota intestinal na aquisição e evolução do SARS-CoV-2. Atua diretamente inibindo a replicação viral, assim como indiretamente modulando a resposta imune. Alguns perfis bacterianos já foram associados com uma maior gravidade dos sintomas, baseado na já bem conhecida conexão intestino-pulmão, com a produção de metabólitos bacterianos e componentes da resposta imune. Sem dúvida, o intestino pode ser alvo de futuras intervenções, através de modulação intestinal, propiciando uma nova e promissora abordagem no manejo terapêutico dos pacientes com COVID-19.

Palavras-chave

ACE2; disbiose; probióticos; SARS; pneumonia

INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal é um importante ecossistema microbiano que abriga uma grande diversidade bacteriana. Essa comunidade atua de maneira integrada com outros órgãos, auxiliando a digestão, modulando a resposta imune, produzindo neurotransmissores e vitaminas, além de manter a integridade da barreira intestinal.

O mecanismo de entrada proposto para o coronavírus reside em sua capacidade de se ligar ao receptor de enzima conversora de angiotensina (ACE2), caracteristicamente um receptor de membrana extracelular expresso em células epiteliais. Em áreas do trato gastrointestinal (GI) com grande expressão de ACE2, como estômago, duodeno e reto, foi encontrada a proteína do capsídeo viral, cuja presença era notavelmente mais baixa em áreas desprovidas de receptores, como o esôfago.⁽¹⁾

Dados recentes sugerem que a colonização viral por meio dos receptores ACE2 expressos no intestino resulte em eliminação viral nas fezes, na forma de diarreia, muito tempo após a resolução da infecção respiratória inicial. Apontam ainda para o fato de que a detecção viral nas fezes ocorre independentemente da presença de diarreia e pode estar presente em até 50% dos pacientes.⁽²⁾

Dessa forma, é difícil imaginar que esse exército bacteriano intestinal não atuará de maneira decisiva na defesa e controle da infecção pelo SARS-CoV-2. Estudos^(3,4)

demonstram que o microbioma intestinal tem um papel importante nesses processos, agindo de duas formas principais. Uma direta, pela supressão da replicação viral, e outra indireta, de maneira inespecífica, mantendo a integridade da barreira intestinal, dificultando a passagem do vírus para a corrente sanguínea (viremia). Além disso, a colonização intensa pelas bactérias dificulta a ligação da partícula viral nos receptores celulares ACE2. Atuam também em células T reguladoras, que irão adequar a resposta imune e diminuir a probabilidade de uma resposta inflamatória exacerbada (tempestade de citocinas), que é um dos principais fatores de risco de gravidade na COVID-19.^(1,5)

Desse modo, a imunidade inata é fundamental para que se esteja mais protegido contra uma infecção, e uma imunidade específica adequada vai fazer com que, caso infectados, se possa desenvolver uma resposta adequada à presença do vírus, diminuindo a probabilidade de desenvolver as formas graves da doença. E o microbioma atua de forma decisiva, tanto na imunidade inata quanto na específica.

Gut e colaboradores⁽³⁾ avaliaram mudanças no microbioma intestinal de pacientes com COVID-19, comparando-o com o de um grupo controle. Esses autores verificaram que os pacientes com COVID-19 apresentaram os três principais sinais de disbiose: diminuição da diversidade, aumento de bactérias com atividade pró-inflamatória e diminuição de bactérias com perfil anti-inflamatório. Assim,

Farmacêutico pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Especialização em Microbiologia pela PUC-PR e em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB).

Instituição: Fundação Universidade Regional de Blumenau - Departamento de Ciências Farmacêuticas. Blumenau-PR, Brasil.

Recebido em 08/09/2020

Artigo aprovado em 18/09/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200009

foram avaliados a proteína C reativa (PCR), procalcitonina (PCT) e D dímero (DD) como indicadores da gravidade da doença. Comparados com o grupo controle, *Agathobacter*, *Fusicatenibacter*, *Roseburia* e *Ruminococcaceae* estavam diminuídos em pacientes COVID-19 e foram correlacionados negativamente com níveis de PCR, PCT e/ou DD. Por outro lado, os gêneros *Streptococcus*, *Rothia*, *Veillonella* e *Actinomyces* estavam aumentados nesses pacientes, assim como os níveis de PCR, PCT e DD.

Somado a isso, *Bacteroides stercoris*, uma espécie bacteriana do filo Bacteroidetes, conhecida pela supressão da expressão de ACE2, que é um ponto de entrada da célula hospedeira para SARS-CoV-2, dificultando a infecção viral. Estes dados destacam um potencial papel benéfico das bactérias simbiotes no combate à infecção.⁽⁵⁾

A redução das Proteobactérias (bactérias Gram negativas) intestinais pode ser uma forma de reduzir o nível de sinais inflamatórios e, assim, reduzir a gravidade de uma infecção por COVID-19. Em situações nas quais há aumento de Proteobactérias no intestino, há uma disbiose, com aumento da permeabilidade intestinal e consequente vazamento de endotoxina pró-inflamatória (LPS, componente da parede celular de bactérias Gram negativas). Essa endotoxina se liga a um receptor celular chamado *Toll Like Receptor 4* (TL4), gerando um quadro de toxemia.^(2,4)

Assim como a microbiota intestinal, existem robustas evidências que sugerem a presença de microrganismos distintos no pulmão. No intestino, bacteroidetes e firmicutes são predominantes, enquanto que bacteroidetes, firmicutes e Proteobactérias são os mais abundantes no pulmão. Curiosamente, a microbiota intestinal demonstrou afetar a saúde pulmonar por meio de uma interligação vital com os pulmões, conhecida como eixo intestino-pulmão. Esse eixo deve ser bidirecional, o que significa que as endotoxinas, metabólitos microbianos, podem impactar o pulmão através do sangue e, quando ocorre inflamação no pulmão, pode afetar a microbiota intestinal também. Isso levanta uma possibilidade interessante de que o novo SARS-CoV-2 também possa ter um impacto na microbiota do intestino. As infecções respiratórias estão associadas a uma alteração na composição da microbiota intestinal. Uma das manifestações clínicas graves de COVID-19 é a pneumonia e a progressão para SARS, especialmente em pacientes idosos com imunocomprometimento.^(2,5)

É lícito considerar a melhoria da eficácia de futuras intervenções imunológicas no combate à COVID-19 com a modulação do microbioma intestinal. Para obtenção de uma microbiota saudável, a abordagem pode incluir medidas que busquem melhorar a produção intestinal de butirato, promovendo interações microbianas por mudanças na dieta e redução de estados pró-inflamatórios.

Abstract

Numerous studies demonstrate the role of the intestinal microbiota in the acquisition and evolution of SARS-CoV-2. It acts directly by inhibiting viral replication, as well as indirectly modulating the immune response. Some bacterial profiles have already been associated with a greater severity of symptoms, based on the well-known intestine-lung connection, with the production of bacterial metabolites and components of the immune response. Undoubtedly, the intestine can be the target of future interventions, through intestinal modulation, providing a new and promising approach in the therapeutic management of patients with COVID-19.

Keywords

ACE2; dysbiosis; probiotics; SARS; pneumonia

REFERÊNCIAS

1. Zhang H, Li HB, Lyu JR, Lei XM, Li W, Wu G, et al. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int J Infect Dis.* 2020; 96:19-24. doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.027.
2. Kumar VCS, Mukherjee S, Harne PS, Subedi A, Ganapathy MK, Patthipati VS, Sapkota B. Novelty in the gut: a systematic review and meta-analysis of the gastrointestinal manifestations of COVID-19. *BMJ Open Gastroenterol.* 2020;7(1):e000417. doi:10.1136/bmjgast-2020-000417.
3. Gu S, Chen Y, Wu Z, Chen Y, Gao H, Lv L, et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients with COVID-19 or H1N1 Influenza. *Clin Infect Dis.* 2020 Jun 4:ciaa709. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa709>.
4. Dhar D, Mohanty A. Gut microbiota and Covid-19 - possible link and implications. *Virus Res.* 2020 Aug;285:198018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198018>.
5. Zuo T, Liu Q, Zhang F, Lui GCY, Tso EY, Yeoh YK, et al. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. [published online ahead of print, 2020 Jul 20]. *Gut.* 2020;gutjnl-2020-322294. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322294>.

Correspondência

Alessandro Conrado de Oliveira Silveira

Fundação Universidade Regional de Blumenau

Departamento de Ciências Farmacêuticas – Campus 3

Rua São Paulo, 2.171

89030-000 – Blumenau-PR, Brasil

Papel do laboratório clínico na pandemia de Coronavírus

The role of the clinical laboratory in the Coronavirus pandemic

Jorge Luiz Joaquim Terrão

Prezado Editor

O grande surto de COVID-19 levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a classificar a doença como uma pandemia em 11/03/2020, o que gerou uma grande corrida para o estabelecimento de tratamentos e metodologias diagnósticas mais eficazes e rápidas. A infecção humana ocasionada pelo Novo Coronavírus (SARS-CoV-2) representa uma grave emergência de saúde pública de âmbito internacional, de acordo com o anexo II do Regulamento Sanitário Internacional. Em decorrência disso, COVID-19 é um evento de saúde pública de notificação imediata. Os laboratórios de análises clínicas (LAC) são responsáveis por 95% das condutas médicas e, no caso do Coronavírus, o laboratório é o responsável pela comprovação etiológica,⁽¹⁾ como também contribui para o monitoramento da doença e a determinação do seu prognóstico.

A finalidade e a função dos profissionais no laboratório clínico consistem em fornecer subsídios clínicos aos médicos, permitindo confirmar ou rejeitar um diagnóstico, fornecer diretrizes de conduta para o monitoramento clínico do paciente, estabelecer um prognóstico, detectar a doença caso a caso e/ou por meio de triagem e monitorar a terapia. Embora a exatidão e a precisão tenham sido sempre pré-requisitos para um bom serviço de laboratório, a rapidez/prontidão ou "tempo de liberação" de um resultado laboratorial é igualmente decisivo para a excelência geral do serviço a ser prestado ao paciente.⁽²⁾ Até onde se sabe, a transmissão se dá de pessoa para pessoa, por contato com gotículas, aerossóis e fômites contendo partículas virais. Além disso, evidências crescentes apontam para a rota de transmissão fecal-oral. O SARS-CoV-2, assim como o SARS-CoV, se liga aos receptores da enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ECA 2) humana, o que permite sua entrada na célula do hospedeiro. A grande afinidade do SARS-CoV-2 com a ECA 2 pode estar relacionada à alta transmissibilidade do novo CoV.⁽¹⁾

O padrão ouro, em se tratando de vírus, é a cultura de tecido, onde o patógeno, ou seja, o vírus é isolado. Com o advento da engenharia genética e a genética reversa, atualmente o padrão ouro é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) precedida da reação de transcriptase reversa (RT-PCR), que detecta o ácido nucleico, no caso em tela, RNA+.⁽³⁾ A pesquisa de antígeno viral por métodos imunocromatográficos, seja por leitura fluorescente ou visual, é uma alternativa a ser considerada em especial por LAC'S que não possuem condições para implementação do setor de biologia molecular.

O diagnóstico laboratorial da COVID-19 usa materiais biológicos coletados das vias aéreas superiores, *swab* de nasofaringe e orofaringe combinados, e das vias aéreas inferiores, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal, líquido pleural e biópsia pulmonar.⁽⁴⁾ Entretanto, esses métodos de detecção dependem fortemente da presença do genoma viral em quantidades suficientes no local da coleta de amostras para que possa ser amplificado. Perder a janela temporal da replicação viral pode fornecer resultados falso-negativos. Da mesma forma, uma coleta incorreta de amostra pode limitar a utilidade do ensaio quantitativo baseado em PCR (qPCR). Um diagnóstico falso-negativo pode ter graves consequências, especialmente neste estágio da pandemia, pois pode permitir que pessoas infectadas espalhem o vírus, dificultando assim os esforços para conter o avanço da doença. Nessas condições, métodos de rastreamento adicionais capazes de indicar a presença de infecção, apesar da carga viral mais baixa, podem ser altamente benéficos para garantir o diagnóstico oportuno de todos os pacientes infectados. A detecção da produção de anticorpos, especialmente imunoglobulina (Ig) M, que são produzidos rapidamente após a infecção, pode ser uma ferramenta que combinada com a RT-PCR pode aprimorar a sensibilidade e a precisão da detecção. Todavia, atualmente, a extensão e a cinética temporal da resposta humoral contra o SARS-CoV-2 não são bem conhecidas.⁽⁵⁾

A pandemia da COVID-19 impôs aos LAC'S grandes desafios em todas as suas fases de produção. Dentre elas destaca na fase pré-analítica o fato de que mesmo tendo rotinas bem estabelecidas para higienização das mãos, desinfecção

Farmacêutico-Bioquímico.

Instituição: Tommasi Laboratório

Recebido em 04/09/2020

Artigo aprovado em 18/09/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200010

de móveis, utensílios e superfícies, estas necessitaram de adaptações específicas às características da doença, por exemplo, a sua alta transmissibilidade. A adaptação das áreas de atendimento e coleta de materiais biológicos, de forma rápida, com o objetivo de garantir o distanciamento mínimo entre colaboradores, entre colaboradores e clientes e entre clientes, para mitigar a possibilidade de transmissão do Sars-CoV-2 por gotículas e aerossóis, foi outro desafio enfrentado pelos LAC'S. A grande demanda por amostras para exames de RT-PCR exigiu dos gestores técnicos dos LAC'S a adaptação dos procedimentos operacionais padrão (POP), em especial com a paramentação e desparamentação dos profissionais responsáveis por estas coletas e mesmo para capacitação de novos colaboradores.

Os métodos sorológicos têm importantes usos clínicos e em saúde pública e clínicos para monitorar e responder à pandemia da COVID-19. Atualmente, não há vantagem evidente se os testes identificam IgA, IgM, IgG ou anticorpos totais. É importante minimizar os resultados dos testes falso-positivos, escolhendo um ensaio com alta especificidade e testando populações e indivíduos com uma probabilidade elevada de exposição prévia ao SARS-CoV-2. Alternativamente, um algoritmo de teste ortogonal (isto é, empregando-se dois testes independentes em sequência quando o primeiro teste produz um resultado positivo) pode ser usado se o valor preditivo positivo esperado de um único teste é baixo. Os anticorpos geralmente se tornam detectáveis uma a três semanas após o início dos sintomas quando as evidências sugerem que a transmissão provavelmente diminuiu bastante e que se desenvolveu algum grau de imunidade contra infecções futuras. No entanto, dados adicionais são necessários antes de se modificarem as recomendações de saúde pública com base nos resultados dos testes sorológicos, incluindo decisões sobre a interrupção do distanciamento físico e o não uso de equipamentos de proteção individual.⁽⁶⁾

O diagnóstico laboratorial de diversos agravos como Aids, hepatites virais e toxoplasmose, dentre outras, através de métodos sorológicos bem estabelecidos, faz parte da rotina laboratorial; entretanto, a COVID-19, por ser emergente, desafia enormemente os LAC'S no tocante à validação dos reagentes, pois pouco conhecemos da cinética do surgimento dos anticorpos (Ac) como resposta a esta infecção. As divergências encontradas entre os resultados das diferentes metodologias sorológicas disponibilizadas ao mercado para os LAC'S têm como base, por exemplo, o uso de diferentes antígeno-alvos empregados nos conjuntos de reagentes, a pureza destes antígenos e o tipo de Ac pesquisado (IgA, IgM, IgG e Ac totais).

A definição de protocolos de validação que permitam conhecer características como sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade destes reagentes mobilizou as sociedades científicas do setor das análises clínicas, bem como gestores técnicos dos LAC'S, para garantir a escolha e o emprego de kits reagentes que atendam os critérios de qualidade analítica especificados e assim garantir resultados confiáveis e seguros.

Os LAC'S necessitaram adaptar seus planos de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde à realidade da COVID-19, por exemplo, pelo aumento do quantitativo de resíduos especificamente contaminados.

Por fim, todo o setor das análises clínicas necessita se perguntar quais os aprendizados que precisamos tirar da situação atual e como podemos nos manter minimamente preparados para situações futuras que venham a se apresentar.

REFERÊNCIAS

1. Bertolini DA, Souza ELS, Silva GEM, Terrão JLJ, Lauer LA, Costa LS, et al. Handbook for COVID 19 Laboratory Management. [acesso em 30 jul 2020]. Disponível em www.ifcc.org.
2. Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. Tradução: Ida Cristina Gubert. - 20ª Ed. - Barueri, SP Manole, 2008. 304 p.
3. Menezes ME. Diagnóstico laboratorial do coronavírus (SARS-CoV-2) causador da COVID-19. 2020. [acesso em 30 jul 2020]. Disponível em: <https://www.sbac.org.br/blog/2020/03/30/diagnostico-laboratorial-do-coronavirus-sars-cov-2-causador-da-covid-19/>
4. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. 2020. [Acesso em: 30 jul 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html#specimen>.
5. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Tang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease - COVID-19. Clin Infect Dis. 2020;71(15):778-785. doi: 10.1093/cid/ciaa310.
6. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing. 2020. [Acesso em: 30 jul 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>.

Correspondência
Jorge Luiz Joaquim Terrão
 Tommasi Laboratório
 Avenida Luciano das Neves, 1.807
 Bairro Divino Espírito Santo
 29107-015 – Vila Velha-ES, Brasil
jterrao@tommasi.com.br

Testes portáteis, remotos ou pontos de cuidados – TLPs – TLRs – POCT

Portable, remote tests or points of care – TLPs – TLRs – POCT

Irineu Keiserman Grinberg

Prezado Editor

Existem equipamentos e dispositivos laboratoriais destinados a realizar exames ao lado do paciente, geralmente à beira do leito hospitalar, ou em unidades de urgência e emergência localizadas em Prontos-Socorros, Unidades de Atendimento (UPA) ou outros estabelecimentos com as mesmas afinidades laborais. Apresentam resultados quase imediatos para exames urgentes, portanto podem antecipar diagnósticos e terapias, bem como a monitorização do paciente no decorrer do tempo que estiver internado. Muitos deles são indispensáveis aos diagnósticos e orientam, de forma precoce, decisões fundamentais na conduta clínica. Um dos melhores exemplos da utilidade desses testes é a pesquisa de marcadores cardíacos em pacientes com dor torácica, pois em poucos minutos podem-se obter resultados de troponina I, mioglobina e CKMB, através de TLP's.

Esses testes laboratoriais, em sua grande maioria, consistem em reações antígeno-anticorpo que ocorrem numa pequena caixa plástica, na qual a amostra a ser examinada e o tampão diluidor percorrem, por migração, o trajeto num leito de nitrocelulose. Em determinado espaço, acontecerá a reação antígeno-anticorpo mediada pelo conjugado. Em resultado reagente, aparecerá uma coloração na linha correspondente. Existe no "pack", em que se realiza a reação, uma segunda linha de leitura chamada de controle da migração, onde sempre deve aparecer a coloração. Caso não apareça, o teste deverá ser invalidado, pois poderá não ter ocorrido a migração. Não se trata de controle de qualidade. Apenas da migração, apesar de alguns profissionais de vendas tentarem afirmar a clientes que o controle da qualidade já vem anexado ao teste.

Nos casos de infecção pelo SARS-CoV-2 serão extremamente úteis na condução de estudos de imunidade, mapea-

mento populacional e liberação de contaminados para as suas atividades profissionais. Não são indicados para o diagnóstico inicial, o padrão ouro é o RT-PCR, que pesquisa o RNA viral ou suas partículas de forma direta. Este teste só pode ser realizado a partir do início dos sintomas até o sétimo dia.

Na consecução poderá acontecer resultado negativo, mesmo que o paciente esteja contaminado, com leves ou moderados sintomas clínicos. Nos casos de maior gravidade em pacientes de UTI, intubados ou não, em termos de quantidade é maior e, desta forma, o RT-PCR poderá perdurar positivo por mais tempo.

Passado o tempo de fase aguda, existe a necessidade de avaliação da formação de anticorpos. São testes de importância fundamental, pois, juntamente com a avaliação clínica, revelarão o estado de imunidade ou mapeamento da população. As imunoglobulinas pesquisadas são a IgM, IgA e IgG. Ou Ig totais. Estão sendo utilizadas as metodologias ELISA EIA, quimioluminescência, QML ou, a maioria, pela modalidade TLP's, preferentemente em soro ou em gota de sangue capilar.

Em quase todas as definições dos TLP's predominam os termos, "são de fácil realização e executados em tempo inferior a 30 minutos". Essa frase foi traduzida e condensada para "testes fáceis", que propiciou o surgimento das mais variadas espécies de profissionais auto-habilitados a realizar esses exames. Essa é uma culpa que deve ser assumida por todo o segmento laboratorial (por quem escreve essa matéria inclusive). Muito mais fácil citar testes rápidos do que Testes Laboratoriais Portáteis, remotos ou POCT. Com essa atitude desprestigiamos o trabalho por nós realizado.

A Anvisa, por meio da RDC 302/2005, efetivada após anos de discussões, possui um capítulo extenso em que trata apenas desses procedimentos. Portanto, há mais de 15 anos já existiam esses cuidados. A RDC expõe de forma clara que todos os TLP's, onde forem realizados, deverão estar

Farmacêutico - Bioquímico. Ex-presidente da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

Instituição: LAB FARM CONSULT LTDA

Recebido em 28/07/2020

Artigo aprovado em 12/08/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200005

vinculados a um laboratório de análises clínicas, cujo responsável técnico será também o tutor das liberações dos laudos e do controle de qualidade.

Entretanto, as farmácias, no presente momento, enquadráveis como estabelecimentos de saúde e em franco crescimento nas atenções voltadas à farmácia clínica, vêm tentando habilitar-se a esse tipo de atendimento através da utilização dos TLP's. As entidades que representam os setores laboratoriais, utilizando-se de atitudes que configuram a manutenção da qualidade laboratorial e a segurança do paciente, não se manifestaram contrárias. Todavia, não abrem mão do cumprimento total da RDC 302/2005 por serem procedimentos laboratoriais. E como tal devem ser tratados.

Pressionada, a Anvisa, numa tentativa de decisão Salomônica, editou a RDC 377/2020, que permite aos estabelecimentos farmacêuticos, de forma temporária (enquanto durar a pandemia causada pelo Novo Coronavírus), a execução dos TLP's para a pesquisa de anticorpos. Essa RDC não contempla nenhum conceito dos sistemas da qualidade laboratorial, apenas refere, de forma muito rápida e superficial, citações de rastreabilidade.

Os TLP's cromatográficos, apesar de existirem há pelo menos 30 anos, requerem vigilância permanente em todos os itens componentes dos sistemas da qualidade interna e externa. Os destinados a pesquisar anticorpos totais ou fracionados para SARS CoV-2 são de criação e manufatura recentes. Possivelmente não foram suficientemente testados ante a necessidade de tê-los disponíveis com muita celeridade e, também, pela necessidade de que os primeiros a se apresentar teriam a vantagem do "pioneirismo" e valores de venda mais proeminentes. A Anvisa licenciou dezenas de marcas, algumas totalmente desconhecidas. As avaliações iniciais dos testes foram realizadas nos laboratórios que os adquiriram e muitos foram enquadrados como inválidos.

As entidades que congregam os laboratórios clínicos, SBPCML, SBAC e Abramed, com o apoio da CBDL, criaram o comitê para avaliação e validação de marcas que se apresentaram de forma voluntária. Ao mesmo tempo, as nossas entidades que mantêm setores de ensaios de proficiência da qualidade laboratorial começaram a produzir material de controle interno e externo para os TLP's que pesquisam anticorpos para o SARS-CoV-2. Já estão disponíveis para todos os laboratórios interessados.

Desta forma, parece que tudo se dirige aos lugares corretos. Os testes estão sendo mais bem avaliados, tanto em especificidade quanto sensibilidade. Os de má qualidade perdem espaços e os valores de aquisições, muito altos no lançamento, estabilizam. Entretanto, ainda é difícil aceitar que um "pack" tenha seu preço fixado em valores aproximados a 10 unidades de testes para hepatite ou gestação. Certamente existe espaço para novas e melhores negociações. A utilização dos mesmos é garantida e em grande volume, pois serão utilizados para o mapeamento imunológico da população no período pós-pandemia.

Contudo, muito teremos que aprender em relação aos aspectos imunitários dessa linhagem viral responsável pela COVID19.

Tudo o que se previa inicialmente em relação aos anticorpos formados pelos pacientes acometidos pelo SARS-CoV-2 é algo similar ao que acontece em outras doenças infecciosas. Primeiro o aparecimento de anticorpos IgM e, após, IgG, que perduravam por um tempo razoável ou de forma permanente, conferindo imunidade.

No entanto, não é o que tem ocorrido. Já foram verificadas algumas variações que vão desde o aparecimento inicial da IgG, sem IgM, bem como um quadro contrário. Foram relatados, também, alguns casos de ausência de soroconversão ou desaparecimento de todos os anticorpos em pouco tempo. Parece tratar-se de um vírus fora da curva habitual, que vai requerer inúmeros estudos focados inclusive na manufatura e testagem de vacinas.

Os TLP's se completam com a utilização de equipamentos fundamentais na execução de procedimentos laboratoriais subsidiários de utilização mais ampliada, porém indispensáveis no monitoramento de pacientes acometidos pelo SARS-CoV-2.

Atualmente, existem empresas que se especializaram em sistemas para traduzir os sinais complexos dos sistemas imunológicos. Desenvolveram e validaram uma plataforma pioneira que propicia, em poucos minutos, a diferenciação entre infecções virais e bacterianas. São ferramentas indispensáveis para minorar o uso de antibióticos e, desta forma, além de orientar a terapia de maneira rápida, diminuir expressivamente a resistência bacteriana.

A *startup* Sight Diagnostics desenvolveu um pequeno equipamento, pouco maior que uma torradeira doméstica, que realiza o hemograma (19 parâmetros) com duas gotas de sangue digital. O resultado do exame é liberado em 90 segundos.

Devem ser lembrados ainda os oxímetros digitais, "sem efeito" existentes há razoável tempo, mas agora com utilização multiplicada no controle da saturação de oxigênio dos pacientes de COVID 19.

Diante dessa tempestade viral que assolou quase todo o planeta, existe a necessidade de respostas tecnológicas atualizadas e eficientes. O laboratório de análises clínicas ocupa posto da mais alta relevância nessa dura e provavelmente longa situação. Portanto, deve buscar por todos os meios possíveis a qualificação necessária para não ser apenas um coadjuvante.

Correspondência

Irineu Keiserman Grinberg

Lab Farm Consult Ltda

Rua Dona Laura, 782 Conj 803 - Bairro Rio Branco

90430-090 – Porto Alegre-RS, Brasil

irineugrinberg@gmail.com

Alterações laboratoriais e a COVID-19

Laboratory alterations and COVID-19

Ricardo Brito de Oliveira Junior¹
Patrick Menezes Lourenço²

Prezado Editor

Mais um surto surge no novo século, incomodando com mais veemência a paz mundial, sendo a sexta vez que a OMS entra com decreto de emergência em saúde pública internacional. Atualmente, estamos vivendo uma pandemia causada por uma nova cepa de Coronavírus, conhecido por SARS-CoV-2, causador do Coronavírus, que determina uma síndrome respiratória aguda de forma muito abrupta. Diante da atual situação mundial, onde ainda não há vacina e medicamentos específicos para o tratamento da virose, vale salientar a importância do conhecimento por todos os profissionais da saúde acerca dos aspectos básicos da biologia viral, epidemiologia, patogênese, resposta imune do hospedeiro e sintomatologia, que são objetos de recentes estudos.

Com a experiência vivida no apoio laboratorial em surtos endêmicos e pandêmicos no continente africano, entre 2013 e 2014, e lidando atualmente com a pandemia de coronavírus nos hospitais da rede privada e oficial do Rio de Janeiro, para nós fica patente a importância da medicina laboratorial na prevenção, diagnóstico e acompanhamento de doentes em situação de calamidade pública. Quando um paciente procura o serviço de urgência ou emergência com queixa e sintomatologia dessa virose, a linha de frente da investigação da suspeita clínica são os testes laboratoriais e de imagem. No caso dos testes de laboratório, esses são constituídos por uma lista básica de analitos conhecida como painel de exames. O objetivo desta carta é discutir sobre as principais alterações desses analitos nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 nas quatro fases do curso da doença.

Na fase 1 (primeira semana de surgimento dos sinais e sintomas), o indivíduo apresenta um estado gripal, com mal-estar, coriza, febrícula intermitente, alteração no olfato e paladar, diarreia (~25%) e conjuntivite. Nessa fase, os exames laboratoriais que podem apresentar algum início de alteração

são os componentes do hemograma, linfócitos tendendo a uma diminuição, devido a uma menor resposta ao vírus, o que é o oposto do que estamos acostumados a encontrar na maioria das viroses, pois os linfócitos possuem em sua membrana plasmática receptores expressos ACE2 para o coronavírus, tornando-se um possível alvo de infecção. Os exames bioquímicos, coagulograma, eletrólitos e equilíbrio ácido-base não mostram alterações relevantes na maioria dos pacientes que se encontram nesta fase da doença.

Na fase 2 (segunda semana de evolução dos sinais e sintomas), começa a surgir tosse seca, a febre tende a aumentar (~37,5 a 38°C), pode iniciar artralgia e mialgia. No hemograma, a linfocitopenia pode começar a se intensificar, mostrando um prognóstico ruim. O aparecimento de leucocitose e/ou neutrofilia pode estar relacionado com infecção bacteriana associada. Os marcadores de fase aguda (como processo inflamatório) começam a aumentar de acordo com a resposta orgânica à infecção. Desses marcadores, o mais utilizado no painel de emergência e urgência é a proteína C-reativa, por sua alta sensibilidade e exibir os aumentos mais dramáticos dentre todos os marcadores de reação de fase aguda, tendo em vista que esse marcador, após realizar a sua ligação, ativa o sistema complemento (via clássica), inicia o processo de opsonização e faz quimiotaxia, estimulando os processos de fagocitose e lise dos antígenos invasores. A proteína C-reativa atua semelhante ao complexo antígeno-anticorpo, reconhecendo substâncias tóxicas de origem autógena liberadas por tecidos lesionados, bem como detoxificando e eliminando, em seguida, esses produtos da corrente sanguínea. De todos os marcadores relacionados com resposta à reação de fase aguda, a proteína C-reativa é a mais sensível, porém com baixa especificidade. Alguns pacientes apresentam, ainda, hipoalbuminemia, pois a albumina encontra-se diminuída na maioria das reações de fase aguda geradas por processo inflamatório. Existem alguns motivos para a diminuição da concentração da albumina, como o aumento da permeabilidade capilar, decorrente da fase exsudativa do processo inflamatório, fazendo com que ocorra a entrada de mais albumina no espaço extravascular, diminuição da síntese em resposta à pressão oncótica coloidal e

¹Biomédico Professor convidado da Pós-Graduação Lato Sensu da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

²Biólogo. Unidade de Laboratório de Análises Clínicas - Hospital Gaffrée e Guinle - Universidade Federal do Estado Rio de Janeiro (Unirio), Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

diminuição da síntese hepática em resposta a citocinas inflamatórias, principalmente a interleucina 6 (IL-6).

Outros analitos também podem sofrer alteração na concentração sanguínea em resposta a uma reação de fase aguda, mas não fazem parte do painel de emergência e urgência. Nessa fase, podemos observar igualmente um início de alteração no Dímero-D, pois a codificação de algumas proteínas não estruturais pelo RNA+ do vírus pode prejudicar a estrutura eritrocitária (o que estimula a coagulação intravascular disseminada) e da hemoglobina, retirando o átomo de ferro necessário para o transporte de oxigênio. Além disso, a infecção causa uma disfunção endotelial, estimulando em excesso a geração de trombina com consequente redução da fibrinólise, promovendo uma hipercoagulabilidade. Essa perda da ligação do ferro, explica, em parte, o início da queda da saturação de oxigênio (SO₂), porém, na maioria dos pacientes ainda encontramos valores entre 93% a 95%. Muitos indivíduos que se encontram nessa fase (~80%) conseguem caminhar para uma boa resolução do problema.

Cerca de 20% dos pacientes evoluem para a terceira fase, que apresenta complicações muito mais abruptas do que as fases anteriores. A evolução para essa fase é rápida, ocorre em média entre o oitavo e o décimo dia. Os sinais e sintomas mais comuns são cronificação de tosse seca e cansaço com dispneia, que explica a queda da SO₂ para os valores entre 90% e 92%. Esses pacientes podem começar a apresentar uma hipóxia tecidual por conta da dispneia, situação que explica os aumentos de lactato e lactato desidrogenase (LDH), pois o lactato é um intermediário no metabolismo dos carboidratos e sua remoção extra-hepática ocorre no músculo estriado esquelético e no córtex renal pelo processo de oxidação. Já a LDH é uma enzima encontrada no citosol de todas as células em concentrações consideráveis e a injúria da célula estimula sua saída e consequente aumento da concentração na corrente sanguínea. O aumento dessa enzima também é indicado pela elevação de lactato, pois ela catalisa a oxidação de 1-lactato a piruvato com a mediação de NAD⁺ comoceptor de hidrogênio. A LDH é amplamente distribuída pelo organismo, possuindo cerca de sete isoenzimas. Nesta discussão, vale salientar a importância da isoenzima 3, pois apresentam altas concentrações nos pulmões, leucócitos, linfonodos, plaquetas e baço. A PCR, o principal marcador de fase aguda na emergência/urgência, atinge valores críticos na maioria dos pacientes dessa fase. O Dímero-D também aumenta sua concentração e alguns pacientes chegam a exibir valores críticos (cerca de seis vezes acima do valor de referência). No coagulograma, observamos alterações nos valores de PTT, que aumenta sua atividade e pode gerar resultados abaixo de 25 segundos em grande parte dos pacientes. O hemograma apresenta trombocitopenia consequente à alteração do sistema de coagulação. A linfocitopenia começa a agravar-se (cerca de quatro linfócitos na leucometria específica) com subsequente leucocitose e neutrofilia pela presença de infecção bacteriana associada, o que não é uma regra.

A evolução da terceira para a quarta fase pode ocorrer entre o décimo segundo e décimo quarto dia, quando cerca de 50% dos pacientes necessitam de intubação por conta das complicações no sistema respiratório e hematológico. Os pacientes apresentam síndrome do desconforto respiratório, sendo a insuficiência respiratória um quadro bastante comum, o que explica a queda da SO₂ para cerca de 80% a 90%, a diminuição do pH ao redor de 7,25 a 7,31 e o aumento da concentração de CO₂ e lactato na corrente sanguínea, caracterizando uma acidose mista (aumento da CO₂, causando acidose respiratória, e aumento da lactato, causando acidose metabólica). Essa situação determina uma hipóxia bastante abrupta, prejudicando órgãos e sistemas que necessitam de grande parte do débito cardíaco, como fígado e rins, fazendo com que as concentrações de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e ureia se elevem na corrente sanguínea.

As alterações do coagulograma se apresentam muito mais críticas do que nas fases anteriores devido à presença de febre elevada (acima de 38°C na maioria dos pacientes) e hipotensão arterial (podendo levar ao choque). É sabido que o aumento da temperatura (causado pela febre) e a diminuição na velocidade do fluxo sanguíneo (causado pela hipotensão arterial) são grandes estimuladores para o sistema de coagulação sanguínea. Não podemos esquecer que as proteínas virais estruturais e não estruturais continuam sendo sintetizadas, prejudicando a estrutura das hemácias e hemoglobina, o que intensifica ainda mais a hipóxia e os valores baixos da SO₂ e a ativação do sistema de coagulação sanguínea.

Com o avanço dessa quarta fase, alguns pacientes apresentam a síndrome hemofagocítica, causando a diminuição do número de hemácias devido ao aumento da atividade dos macrófagos do sistema reticuloendotelial esplênico e hepático, podendo levar a uma esplenomegalia, hepatomegalia (aumentando a ALT e AST na corrente sanguínea), hepatoesplenomegalia e linfonodomegalia sistêmica com presença de *rash* cutâneo. Essa síndrome causa aumento significativo de potássio e LDH, que continuam evoluindo junto com a sintomatologia.

Os indivíduos que exibem esse quadro por mais de três a cinco dias começam a apresentar alterações nos marcadores cardíacos (Troponina I, CPK total, CPK-MB atividade, CPK-MB massa e Mioglobina) em decorrência de distúrbios da coagulação, hipotensão arterial, hipóxia e síndrome hemofagocítica.

O uso de hidroxicloroquina (ainda em estudo) pode causar alterações nos exames laboratoriais de acordo com a fase da doença, dose administrada e interação medicamentosa. Essas alterações podem ocorrer principalmente nos eletrólitos (Na, K, Mg e Ca), marcadores cardíacos, glicemia, fosfatase alcalina (FAL), gama glutamiltranspeptidase (GGT), ALT, AST e Pro-BNP. A administração de azitromicina é feita quando ocorre uma infecção bacteriana conjunta. Este fármaco pode levar a alterações de FAL, GGT, AST, ALT, ureia, coagulograma, plaquetas, Na, K, Ca e Mg.

Uma questão que pode ser levantada é se outros analitos que não fazem parte do painel de exames laboratoriais de emergência e urgência podem auxiliar na avaliação do comprometimento orgânico da infecção em suas complicações e tratamento. Como, por exemplo, a ferritina no processo de dano eritrocitário e da hemoglobina, na retirada do átomo de ferro por proteínas não estruturais sintetizadas pelo vírus, a alfa1-antitripsina, que é sintetizada no fígado, mas mantém maior parte da sua atividade (~98%) de inibição de proteases no parênquima pulmonar, a alfa1-glicoproteína ácida, uma lipocalina que possui a função de ligar substâncias lipofílicas, a alfa2-macroglobulina, sintetizada no fígado, mas que tem a função de inibir proteases no plasma sanguíneo, a ceruloplasmina, que contém cerca de 95% do cobre sérico, possuindo como uma das funções a regulação vital do ferro e realizando sua oxidação para posterior incorporação à transferrina, a haptoglobina, que se liga irreversivelmente à hemoglobina, evitando sua perda por via renal, fazendo dela um excelente marcador de hemólise, a hemopexina, responsável pelo transporte do heme livre, o que evita sua toxicidade, a transferrina, principal proteína transportadora de ferro para hemoglobina, mioglobina, citocromos, fígado e sistema retículo-endotelial, as proteínas do complemento, principalmente C3 e C4, a interleucina 6 e o fator de necrose tumoral alfa, que são substâncias relacionadas intimamente com o processo inflamatório e que realizam uma potente quimiotaxia, estimulando e inibindo células e outros componentes do sistema imunológico.

O Ministério da Saúde tem afirmado que os testes em massa para a Covid-19 são necessários para o entendimento do comportamento da doença e para definir as melhores estratégias e ações. Se os dados preliminares estiverem corretos, 80% dos pacientes com a COVID-19 não apresentam sintomas ou são pouco sintomáticos. Nesse cenário, a concentração dos testes em pacientes internados e em estado mais graves não vai permitir entender a epidemiologia da doença, o que implica o não conhecimento da sua incidência, evolução, prevalência, transmissibilidade e letalidade.

O desenvolvimento de um painel laboratorial como os que existem para outras doenças irá ajudar na avaliação do curso da doença e facilitar a solicitação de exames para a investigação clínica.

BIBLIOGRAFIA

- Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020 Apr;18(4):844-847. doi:10.1111/jth.14768
- Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky PH, Behillil S, et al. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis*. 2020 Jun;20(6):697-706. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30200-0. (published correction appears in *Lancet Infect Dis*. 2020 May 19; and in *Lancet Infect Dis*. 2020 Jun;20(6):e116).
- Yuan J, Zou R, Zeng L, Kou S, Lan J, Li X, et al. The correlation between viral clearance and biochemical outcomes of 94 COVID-19 infected discharged patients. *Inflamm Res*. 2020;69(6):599-606. doi:10.1007/s00011-020-01342-0.
- Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: the mystery and the miracle. *J Med Virol*. 2020; 92(4):401-402. doi:10.1002/jmv.25678.
- Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al.; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1708-1720. doi:10.1056/NEJMoa2002032
- Lippi G, Henry BM. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Respir Med*. 2020;167:105941. published online Mar 24. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105941>.

Correspondência

Ricardo Brito de Oliveira Junior

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

CCS, bloco 12, SAA 029,

20540-140 - Rio de Janeiro-RJ, Brasil

rbjbiomed@gmail.com

Patrick Menezes Lourenço

Unidade de Laboratório de Análises Clínicas

Hospital Gaffrée e Guinle

Universidade Federal do Estado Rio de Janeiro (Unirio)

Rua Mariz e Barros, 775 - Tijuca

Rio de Janeiro-RJ, Brasil

patrickbioclinico@gmail.com

Relação neutrófilo-linfócito e resposta imune como fatores de prognóstico para COVID-19

Neutrophil-lymphocyte relationship and immune response as prognostic factors for COVID-19

João Marcelo Ramalho Alves

Prezado Editor

Ao final de 2019, uma síndrome respiratória aguda grave, associada à tempestade de citocinas descontroladas, causada pelo novo coronavírus-2 (SARS-CoV-2), foi identificada em Wuhan, na China, e rapidamente se espalhou pelo mundo. Atualmente temos mais de 21 milhões de casos, mais de 755 mil mortos em 218 países.

A comunidade científica internacional nunca experimentou período de tão intensa produção de pesquisas nas áreas da epidemiologia, diagnóstico tendo como base os passos anteriormente trilhados nas pandemias de SARS-CoV(2002/03) e MERS-CoV (2012/13), que acometeram a Ásia e o Oriente médio, respectivamente.

A doença é dividida em três fases: 1) fase de replicação viral, onde o vírus se liga a receptores ACE2 prioritariamente nas células do aparelho respiratório, iniciando o ciclo de infecção, que dura geralmente até o sétimo dia da doença; 2) fase pulmonar, caracterizada pelo processo imunotrombótico, com aparecimento de infiltrados pulmonares em vidro fosco, febre mais elevada, dispnéia e uma variedade de reações inflamatórias, ocorrendo entre o oitavo e o décimo segundo dias; 3) fase de hiperinflamação, na qual alguns pacientes apresentam piora clínica, caracterizada por insuficiência respiratória, choque, hipotensão e tromboembolismo, como consequência da tempestade de citocinas.

O desempenho dos testes diagnósticos está intimamente relacionado com a cinética viral da COVID-19, onde o tempo de contágio, a fase da doença e a gravidade da infecção podem apresentar alterações em seus resultados.

O padrão ouro de identificação viral é o RT-PCR na detecção do vírus, sendo realizado a partir da coleta de células da nasofaringe com auxílio de *swabs*, bem como escarro ou fluido bronco alveolar (BALF), que são transportados em meio viral. No entanto, a taxa positiva das amostras analisa-

das demonstrou-se inferior a 75%. Desta forma, ensaios imunológicos para SARSCoV-2 são necessários para se diagnosticar, com precisão, a COVID-19. Os anticorpos SARS-CoV-2 IgM específicos foram detectados usando-se um ensaio imunocromatográfico de ouro coloidal SARS-Coloidal (GICA). Os resultados foram analisados em combinação com a data de coleta da amostra e informações clínicas (Quadro 1). O GICA foi concordante com os casos positivos detectados por RT-qPCR-COVID-19 em 82,2% (37/45), bem como em 32,0% (8/25) nos pacientes clinicamente confirmados RT-qPCR negativos (análise no período de 4-14 dias após o início do sintoma). A investigação de pacientes com IgM negativo, RT-qPCR-positivo-COVID-19 mostrou que metade deles desenvolveu doença grave.^(1,2)

Quadro 1 - Relação entre detecção de IgM, data de coleta da amostra e situação clínica do paciente

IGM	< 3 dias	4 - 7 dias	15 - 21 dias
Leve/Moderada	38%	64%	100%
Grave	0%	16,7%	75%

A relação neutrófilo/linfócito (NRL) pode ser útil como preditor de gravidade e desfecho da doença. Quanto maior o NRL, maior o valor de citocinas inflamatórias (IL-2, IL-6 e IL-10) e maior serão os valores de IgG e, consequentemente, maior será a gravidade com pior prognóstico.⁽³⁾

Uma ativação imune exagerada com altos níveis de IgG foi associada à gravidade, onde fenótipos NRL elevado - IgG elevado, NRL elevado - IgG baixo, NRL baixo - IgG elevado e NRL baixo - IgG baixo foram de 72,3%, 48,5%, 33,3% e 15,6 respectivamente. Além disso, a elevação das taxas de NRL e IgG também estiveram associadas a aumento de citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, a taxa de recuperação de pacientes graves estava, segundo este estudo, inversamente

¹Médico Intensivista, Superintendente do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle - HUGG/EBSERH - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Unirio). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Instituição: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (Unirio). Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 21/09/2020
Artigo aprovado em 30/09/2020
DOI: 10.21877/2448-3877.20200014

proporcional, ou seja, quanto menores o NRL e o IgG, maior a chance de recuperação (Figura 1).⁽³⁾

O IgG para SARS-CoV-2 é inicialmente detectado após quatro dias de doença, atingindo pico em média de quatro semanas. Títulos altos e precoces foram observados em casos graves, enquanto que, em casos leves, os resultados na maioria foram títulos baixos de IgG, sustentando a hipótese de que uma resposta imune robusta também levaria a maiores danos em tecidos imunomediados.

A linfopenia com NRL elevado também já foi descrita em pacientes com maior gravidade, tornando o NRL um bom indicador de imunidade inata e o IgG um indicador de imunidade adquirida.

Enquanto isso, uma resposta tardia da IgM estaria associada à gravidade. A investigação de pacientes com IgM negativo com RT-PCR positivo mostrou que metade destes evoluiu para formas graves da COVID-19, levando a crer que pacientes nestas situações não desenvolveram níveis detectáveis de anticorpos IgM no início da doença.⁽²⁾

Os testes laboratoriais traduzem, portanto, uma ferramenta de auxílio a tomadas de decisões clínicas no diagnóstico da fase da doença por infecção causada pelo SARS-CoV-2, cujos resultados negativos ou positivos devem ser cuidadosamente analisados, pois resultados negativos não são exclusivos e devem ser interpretados com auxílio dos dados clínicos.

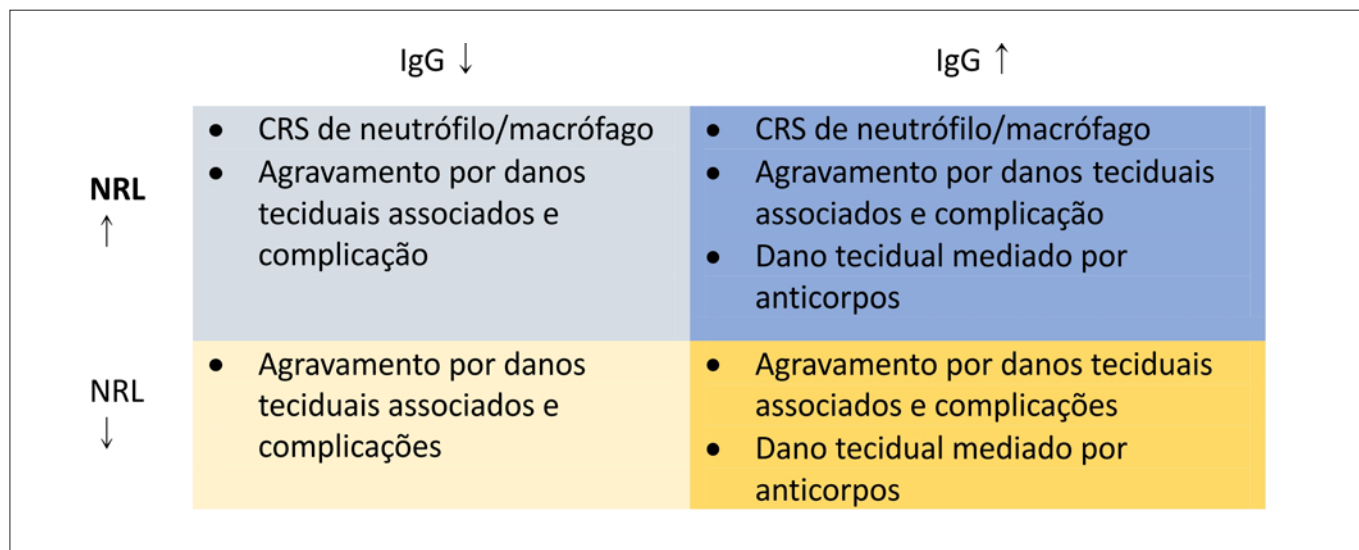


Figura 1. Relação NRL/IgG e gravidade da doença.

REFERÊNCIAS

1. Ma H, Zeng W, He H, Zhao D, Jiang D, Zhouet P, et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cell Mol Immunol*. 2020 Jul;17(7):773-775. doi: 10.1038/s41423-020-0474-z. Epub 2020 May 28.
2. Shen L, Wang C, Zhao J, Tang X, Shen Y, Lu M, et al. Delayed specific IgM antibody responses observed among COVID-19 patients with severe progression. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):1096-1101. doi: 10.1080/22221751.2020.1766382.
3. Zhang B, Zhou X, Zhu C, Song Y, Feng F, Qiu Y, et al. Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. *Front Mol Biosci*. 2020 Jul 3;7:157. doi: 10.3389/fmolb.2020.00157. eCollection 2020.

Correspondência

João Marcelo Ramalho Alves
 Hospital Universitário Gaffreé e Guinle - HUGG/EBSERH - Unirio
 Rua Mariz e Barros, 775 - Tijuca
 20270-004 – Rio de Janeiro-RJ, Brasil
 joaoramalhoalves@gmail.com

Possíveis abordagens farmacológicas para SARS-CoV-2

Possible pharmacological approaches to SARS-CoV-2

Guilherme Eduardo da Silva Ribeiro

Prezado Editor

A partir da divulgação do primeiro caso, em 12 de dezembro de 2019, ocorrido na cidade de Wuhan, China,⁽¹⁾ a ciência médica deparou-se com um gigantesco desafio – encontrar medicamentos para a prevenção e o tratamento deste novo agente infeccioso. Apesar de novo, esse agente é muito semelhante na sintomatologia a outras infecções respiratórias virais. Apresenta similaridades filogenéticas com coronavírus causadores da SARS (SARS-CoV) e MERS (MERS-CoV).⁽²⁾ O genoma deste novo vírus exibe 96% de similaridade com o do vírus RaTG13, obtido do morcego *Rhinolophus affinis*. O domínio ligante do receptor do SARS-CoV-2 adere com alta afinidade ao receptor ACE2 humano.⁽³⁾

Não há vacina ou medicamento com eficácia comprovada para o tratamento do vírus, apesar de várias pesquisas estarem em andamento. Portanto, o tratamento da doença se concentra principalmente no tratamento sintomático e na oxigenoterapia.⁽⁴⁾ Com o rápido crescimento na transmissão da doença, a procura por moléculas disponíveis com mecanismo de ação determinado e com possíveis atividades contra o vírus foi iniciada.

A patogênese da infecção por SARS-CoV-2 em humanos permanece incerta. A função imunológica exerce papel vital para melhores desfechos do processo infeccioso.⁽⁴⁾

Alterações imunes em pacientes com SARS, MERS e influenza, especialmente alterações nos subconjuntos de linfócitos T do sangue periférico, contribuem para o entendimento das características, diagnóstico, monitoramento, prevenção e tratamento da doença.⁽⁴⁾

Existem três linhas de abordagem para a descoberta de medicamentos para se desenvolver um novo medicamento para SARS-CoV-2. Essas abordagens levam a possíveis opções de tratamento, incluindo o redirecionamento de medicamentos, a triagem de bancos de dados moleculares empregando-se ferramentas de modelagem de drogas e a triagem das bibliotecas de compostos em ensaios antivirais, sendo que a terceira opção não é compatível devido à alta taxa de transmissão na comunidade. Assim, o redirecionamento de medicamentos e as análises computacionais de acoplamento são

as duas principais abordagens atuais para se encontrarem possíveis agentes para a terapia do SARS-CoV-2.⁽⁵⁾

CANDIDATOS A MEDICAMENTOS

Como o SARS-CoV-2 cursou para uma pandemia, causando um grande número de mortes, devido à sua transmissão rápida, a descoberta de medicamentos contra o vírus é, dessa forma, uma prioridade urgente. No entanto, atualmente não existem medicamentos bem-sucedidos para o tratamento da COVID-19. O redirecionamento de medicamentos com base em drogas já existentes, como metodologia ativa para o desenvolvimento de medicamentos para reduzir o tempo e o custo em comparação com a descoberta de novos medicamentos, tem sido bastante considerado.

Remdesivir

Vários ensaios clínicos estão atualmente em curso (Gilead "SIMPLE" Trials, Pediatric Trial, REMDACTA Trial). O FDA (Food and Drug Administration) disponibilizou o remdesivir sob autorização de uso emergencial para o tratamento de adultos e crianças com doença grave causado pelo vírus.⁽⁶⁾ O remdesivir (GS-5734) é um pró-fármaco que apresenta ação antiviral de amplo espectro, inibidor da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), com atividade inibitória contra SARS-CoV e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). Foi identificado precocemente como candidato promissor à terapêutica para o COVID-19 devido à sua capacidade de inibir SARS-CoV-2 *in vitro*. Além disso, em estudos com primatas não humanos, o remdesivir iniciado 12 horas após a inoculação com MERS-CoV reduziu os níveis de vírus pulmonares e danos nos pulmões.⁽⁷⁾ Foi relatado que um paciente americano com 2019-nCoV se recuperou após receber remdesivir intravenoso em 7 de janeiro, dentro de um ensaio em pacientes com 2019-nCoV (NCT04252664 e NCT04257656).⁽⁸⁾

No protocolo de uso do remdesivir para o tratamento da COVID-19 (em adultos), a Sociedade Espanhola de Farmácia Hospitalar propõe o seguinte regime posológico:

Critical Care Pharmacist - Medical Sciences M.Sc.

Instituição: Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião – Saúde. Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 04/08/2020

Artigo aprovado em 17/08/2020

DOI: 10.21877/2448-3877.20200015

Dose de ataque e de manutenção:

- Dose de ataque no primeiro dia de 200 mg/EV, seguida por uma dose de manutenção de 100 mg/EV por dia, do 2º ao 10º dia.

Precauções a serem observadas:

- Lavar o equipo com 30 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, após a infusão da solução medicamentosa;
- Monitorar possível quadro hipotensivo durante a administração;
- Suspende o uso de lopinavir/ritonavir e interferon β;

Preparação e administração da solução:

- Frasco de 150 mg de remdesivir. Cada frasco-ampola deve ser reconstituído com 30 mL de água para injetáveis (API), obtendo-se uma concentração final de 5 mg/mL. A dose é diluída em 100 mL-250 mL de soro fisiológico com infusão em trinta minutos;
- Frasco de 100 mg de remdesivir. Cada frasco-ampola deve ser reconstituído com 19 mL de água para injetáveis (API), obtendo-se uma concentração final de 5 mg/mL. A dose é diluída em 100-250 mL de soro fisiológico com infusão em trinta minutos;
- Estabilidade. Quatro horas em temperatura ambiente e 24 horas em geladeira.⁽⁹⁾

Cloroquina e Hidroxicloroquina

Apesar de atualmente a aplicação de cloroquina e hidroxicloroquina ser desaconselhada pela comunidade científica internacional para o tratamento de pacientes com COVID-19, em decorrência da grande controvérsia que se estabeleceu em âmbito mundial, relatar seu uso é importante como fato histórico da medicina contemporânea.^(10, 11)

A cloroquina, um medicamento amplamente utilizado no tratamento da malária e doenças reumatológicas, tem sido relatada como uma substância com potencial antiviral de amplo espectro *in vitro*, empregando células Vero10. Wang et al. relataram que a cloroquina bloqueia a infecção por vírus, aumentando o pH endossômico necessário para a fusão vírus/célula, bem como interfere na glicosilação dos receptores celulares de SARS-CoV. De acordo com esses autores, além de sua atividade antiviral, a cloroquina parece possuir uma atividade imunomoduladora que pode aumentar sinergicamente seu efeito antiviral *in vivo*. Ainda conforme Wang et al., a cloroquina é amplamente distribuída em todo o corpo, incluindo o pulmão, após administração oral.⁽¹²⁾

A segurança e a eficácia da cloroquina e hidroxicloroquina, contudo, têm sido avaliadas em ensaios clínicos randomizados, séries de casos e estudos observacionais com resultados pouco animadores. Nesse sentido, o uso da cloroquina e da hidroxicloroquina deve ser restrito a protocolos de pesquisa aprovados em Comites de Ética em Pesquisa com consentimento formal do paciente ou seu responsável.^(10,11)

O sulfato de hidroxicloroquina, um derivado da cloroquina, foi sintetizado pela primeira vez em 1946 pela inserção de um grupo hidroxila na molécula da cloroquina e mostrou-se muito menos (~ 40%) tóxico em animais.⁽¹³⁾ A hidroxicloroquina está disponível para o tratamento de doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide. As duas moléculas compartilham estruturas e mecanismos químicos semelhantes para servir como base fraca e imunomodulador. Análises *in vitro* em células Vero demonstraram que a potência da hidroxicloroquina (EC50 de 0,72 mM) foi maior que a da cloroquina contra SARS-CoV-2.^(10,14)

No protocolo de uso da hidroxicloroquina para o tratamento da COVID-19 em adultos, a Sociedade Espanhola de Farmácia Hospitalar propunha o seguinte regime posológico: 400 mg q12h via oral (VO) no primeiro dia, seguido de 200 mg q12h (VO) por quatro dias.⁽⁹⁾

Efeitos adversos

A cloroquina e a hidroxicloroquina têm um perfil de toxicidade semelhante, embora a hidroxicloroquina seja mais bem tolerada e tenha menor incidência de toxicidade do que a cloroquina.

Efeitos adversos cardíacos

Prolongamento do intervalo QTc (QT corrigido), Torsade de Pointes, arritmia ventricular e morte cardíaca. O risco de prolongamento do intervalo QTc é maior para a cloroquina do que para a hidroxicloroquina. O uso concomitante de medicamentos que apresentam risco moderado a alto para o prolongamento do intervalo QTc [por exemplo, antiarrítmicos, antipsicóticos, antifúngicos, macrolídeos (incluindo azitromicina) e antimicrobianos do grupo das fluoroquinolonas] devem ser usados apenas se necessário. Considere-se usar doxiciclina em vez de azitromicina como terapia empírica para pneumonia atípica.⁽¹⁵⁾

O acompanhamento eletrocardiográfico é recomendado quando houver interações medicamentosas em potencial ou doenças cardíacas subjacentes.⁽¹⁶⁾ A relação risco-benefício deve ser cuidadosamente avaliada em pacientes com doença cardíaca, histórico de arritmia ventricular, bradicardia (<50 batimentos por minuto) ou hipocalemia não corrigida e/ou hipomagnesemia.⁽¹⁵⁾

Outros efeitos adversos

Hipoglicemia, erupção cutânea e náusea (doses divididas podem reduzir náusea). Retinopatia, supressão da medula óssea podem ocorrer com o uso a longo prazo, mas isso não é provável com o uso a curto prazo.⁽¹⁵⁾

Nitazoxanida

A nitazoxanida é um medicamento aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de diarreia e enterite infecciosa, causada por parasitas com um bom perfil de segurança. No entanto, esse agente antimicrobiano

tiazolídico tem sido considerado um candidato em potencial contra infecções respiratórias virais.⁽¹⁷⁾ Os resultados da eficácia da nitazoxanida em humanos com infecções respiratórias são limitados a um pequeno número de ensaios e os resultados são contrastantes. Em um estudo de fase 2b/3, duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, com 624 participantes com idades entre 12 e 65 anos e com doença semelhante à influenza, foi mostrado que 600 mg de nitazoxanida duas vezes ao dia por cinco dias diminuiu o tempo entre a primeira dose e o alívio dos sintomas em comparação com o placebo, com uma baixa taxa de eventos adversos graves (4%).⁽¹⁸⁾ No entanto, são necessárias mais evidências sobre os efeitos hepatorenais e cardiovasculares, bem como sobre a teratogenicidade.⁽¹⁹⁾ Até o momento, 17 protocolos de ensaios clínicos estão registrados no ClinicalTrials.gov, avaliando os efeitos da nitazoxanida no tratamento da COVID-19.

REFERÊNCIAS

- Kim JY, Choe PG, Oh Y, Oh KJ, Kim J, Park SJ, et al. The first case of 2019 novel Coronavirus pneumonia imported into Korea from Wuhan, China: implication for infection prevention and control measures. *J Korean Med Sci.* 2020 Feb 10;35(5):e61. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e61. PMID: 32030925; PMCID: PMC7008073.
- Jaimes JA, André NM, Chappie JS, Millet JK, Whittaker GR. Phylogenetic analysis and structural modeling of SARS-CoV-2 spike protein reveals an evolutionary distinct and proteolytically sensitive activation loop. *J Mol Biol.* 2020;432(10):3309-3325. doi:10.1016/j.jmb.2020.04.009.
- Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2020;26(4):450-452. doi:10.1038/s41591-020-0820-9.
- Lin L, Lu L, Cao W, Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):727-732. doi:10.1080/22221751.2020.1746199.
- Almasi F, Mohammadipanah F. Hypothetical targets and plausible drugs of Coronavirus infection caused by SARS-CoV-2. *Transbound Emerg Dis.* 2020 Jul 13. doi: 10.1111/tbed.13734. Online ahead of print.
- Gilead Sciences: Remdesivir Clinical Trials. [publicação na web]; 2020 acesso em 27 de julho de 2020. Disponível em <https://www.gilead.com/purpose/advancing-global-health/covid-19/remdesivir-clinical-trials>
- McMahon JH, Udy A, Peleg AY. Remdesivir for the treatment of Covid-19 - Preliminary Report [published online ahead of print, 2020 Jul 10]. *N Engl J Med.* 2020;383:10.1056/NEJMc2022236#sa2. doi:10.1056/NEJMc2022236.
- Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med.* 2020;382(10):929-936. doi:10.1056/NEJMoA2001191.
- Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria [página na internet]. Procedimientos de Farmacia Hospitalaria para la Gestión del Tratamiento con Antivirales en la Enfermedad por el Nuevo Coronavirus SARS-COV-2 (covid-19). [acesso em 27 de julho de 2020]. Disponível em: https://www.sefh.es/fichadjuntos/200316/Procedimientos_SEFH_COVID_19.pdf
- Ramos filho CF, Daniel-ribeiro CT, Tabak DG, et al. Nota sobre o uso da cloroquina/ Hidroxicloroquina para o tratamento de Covid-19. Informe ENSP - Escola nacional de saúde Pública, 2020. Acesso em 30 jul 2020. Disponível em <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/informe/site/materia/detalhe/48989>
- Imoto AM, Gottens LBD, Branco HPC, et al. Cloroquina e Hidroxicloroquina no tratamento da COVID-19: Sumário de Evidências. *Comunicação em Ciências da Saúde* 31 (Suppl 1): 17-30, 2020.
- Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020;30(3):269-271. doi: 10.1038/s41422-020-0282-0.
- De Clercq E. New Nucleoside Analogues for the Treatment of Hemorrhagic Fever Virus Infections. *Chem Asian J.* 2019 Nov 18;14(22):3962-3968. doi: 10.1002/asia.201900841.
- Yao X, Ye F, Zhang M, Cui C, Huang B, Niu P, et al. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):732-739. doi: 10.1093/cid/ciaa237
- COVID-19 Treatment Guidelines. [acesso em 29 de julho de 2020]. Disponível em: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/antiviral-therapy/chloroquine-or-hydroxychloroquine/>
- American College of Cardiology [página na internet]. Ventricular arrhythmia risk due to hydroxychloroquine-azithromycin treatment for COVID-19. [acesso em 29 de julho de 2020]. Disponível em: <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/articles/2020/03/27/14/00/ventricular-arrhythmia-risk-due-to-hydroxychloroquine-azithromycin-treatment-for-covid-19>.
- Ashiru O, Howe JD, Butters TD. Nitazoxanide, an antiviral thiazolide, depletes ATP-sensitive intracellular Ca²⁺ stores. *Virology.* 2014 Aug;462-463:135-48. doi: 10.1016/j.virol.2014.05.015
- Haffizulla J, Hartman A, Hoppers M, Resnick H, Samudrala S, Ginocchio C, et al; US Nitazoxanide Influenza Clinical Study Group. Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial. *Lancet Infect Dis.* 2014 Jul;14(7):609-18. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70717-0.
- Pepperrell T, Pilkington V, Owen A, Wang J, Hill AM. Review of safety and minimum pricing of nitazoxanide for potential treatment of COVID-19. *J Virus Erad.* 2020 Apr 30;6(2):52-60. doi: 10.1016/S2055-6640(20)30017-0.

Correspondência

Guilherme Eduardo da Silva Ribeiro
 Instituto Estadual de Infectologia São Sebastião
 Rua Sacadura Cabral, 178, Anexo 4 – Saúde
 Rio de Janeiro-RJ, Brasil
guilhermeeduardo@id.uff.br



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC], criada em 1969, é o órgão oficial de divulgação científica da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas [SBAC]. A RBAC tem circulação trimestral e seus artigos estão indexados no LILACS [Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde].

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [RBAC] é publicada em português e inglês e é dedicada à divulgação de pesquisa científica de qualidade metodológica reconhecida, relacionada às várias áreas das análises clínicas e da patologia clínica veterinária.

Ao submeter o original do manuscrito, os autores assumem a responsabilidade do manuscrito não ter sido previamente publicado e nem estar sendo simultaneamente analisado por outro periódico, quer na íntegra ou parcialmente, excetuando-se resumos ou relatórios preliminares publicados em anais de reuniões científicas. Todos os autores deverão assinar e encaminhar a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais, assumindo formalmente a autoria pelo manuscrito e oficializando a cessão do copyright. A declaração assinada deverá ser remetida sob a forma de documento em ".pdf". As opiniões, asserções e conclusões emitidas nos manuscritos, bem como a veracidade das informações e citações bibliográficas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

Os autores deverão declarar no manuscrito qualquer potencial conflito de interesse, incluindo aqueles de natureza política e financeira. O documento formal de conflito de interesse é a Declaração de Responsabilidade, Conflito de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais mencionada acima.

Os autores deverão declarar todas as fontes de financiamento ou suporte público ou privado recebidas para a realização do estudo. No caso de estudos realizados sem recursos financeiros, da mesma forma, os autores deverão declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

Quando a investigação envolver seres humanos, a publicação do manuscrito estará condicionada ao cumprimento irrestrito das diretrizes normativas do Conselho Nacional de Saúde [CNS] e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa [CONEP]. A declaração de que os procedimentos seguidos nos experimentos estão em consonância com os princípios éticos aceitos pelas normativas nacional (Resolução CNS 466/2012) e internacional (Declaração de Helsinki/ World Medical Association) deverá ser explicitamente firmada no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética em Pesquisa [CEP] da instituição responsável pela investigação deverá ser também aí declarado. Uma cópia em ".pdf" da autorização do CEP deverá ser encaminhada juntamente com o manuscrito. Quando se tratar de pesquisa com animais, as normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal [CONCEA] e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [COBEA], bem como do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Institute for Laboratory Animal Research/ National Academy of Science - USA] deverão ser incondicionalmente respeitadas e seu cumprimento também deverá ser declarado, explicitamente, no último parágrafo da seção Material e Métodos. O número do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais [CEUA] da instituição responsável pela pesquisa deverá ser igualmente declarado e uma cópia em ".pdf" da autorização do CEUA deverá ser, da mesma forma, encaminhada com o manuscrito. Quando os autores forem filiados a instituições não brasileiras, estes deverão declarar no manuscrito o cumprimento de diretrizes normativas e remeter documentação local de mesmo efeito legal.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial de Saúde [OMS], do International Committee of Medical Journal Editor [ICMJE] e do Workshop ICTRP. Desse modo, somente serão aceitos para publicação os artigos de ensaios clínico-laboratoriais que tenham recebido um número de identificação em um dos registros de ensaios clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. Entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são: Australian New Zealand Clinical Trials Registry [ANZCTR], International Standard Randomised Controlled Trail Number [SRCTN], Netherlands Trial Register [NTR], UMIN Clinical Trials Registry [UMIN-CTR], WHO International Clinical Trials Registry Platform [ICTRP]. No entanto, o número de identificação obtido no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>) do Ministério da Saúde [DECIT/MS], Organização Panamericana de Saúde [OPAS] e Fundação Oswaldo Cruz [Fiocruz]

é igualmente aceito pela RBAC. O número de identificação/ identificador primário deverá ser declarado ao final da seção Material e Métodos.

Apenas serão recebidos manuscritos que estejam rigorosamente de acordo com as normas aqui especificadas. Os manuscritos serão avaliados por pareceristas/ revisores indicados pelo Conselho Editorial e/ou, eventualmente, pelos autores. Quando indicados pelos autores, deverá ser informado nome completo dos pareceristas/ revisores, e-mail e instituição de origem. O Conselho Editorial se reserva o direito, no entanto, de acatar ou não a sugestão de pareceristas/ revisores por parte dos autores. A aceitação dos manuscritos será feita em função da originalidade, importância e contribuição científica para o desenvolvimento da área. Manuscritos aprovados poderão sofrer alterações de ordem editorial, desde que não alterem o mérito do trabalho. Manuscritos recusados pelos pareceristas/ revisores serão informados imediatamente aos autores.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* está estruturada em 15 seções ou áreas temáticas, cuja indicação deverá ser feita pelos autores, no momento da submissão do manuscrito, sendo elas:

1. Bacteriologia Clínica
2. Virologia Clínica
3. Micologia Clínica
4. Parasitologia Clínica
5. Imunologia Clínica
6. Bioquímica Clínica e Biologia Molecular
7. Hematologia Clínica e Imunohematologia
8. Citologia Clínica e Anatomia Patológica
9. Boas Práticas de Laboratório Clínico e Biossegurança
10. Gestão e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico
11. Bioética e Ética em Pesquisa
12. História da Saúde e Ensino das Análises Clínicas
13. Microbiologia de Alimentos
14. Patologia Clínica Veterinária/ Medicina Veterinária Laboratorial
15. Toxicologia Clínica e Biologia Forense

Os manuscritos poderão ser submetidos dentro das categoriais de comunicação científica designadas abaixo:

ARTIGOS ORIGINAIS: trabalhos nos quais são informados os resultados obtidos em pesquisas de natureza empírica ou experimental original, cujos resultados possam ser replicados e/ou generalizados. Deverão atender aos princípios de objetividade e clareza da questão norteadora. Os artigos originais deverão ser estruturados de maneira a conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 250 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

ARTIGOS DE REVISÃO: trabalhos com avaliações críticas e sistematizadas da literatura sobre um determinado assunto que deverá dar ao leitor uma cobertura geral acerca do tema apresentado. Os artigos de revisão deverão conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract não estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), texto ordenado (títulos e subtítulos), opiniões e conclusões (quando couber) e referências bibliográficas (até 30 referências). O trabalho não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências. Estes trabalhos são escritos a convite do editor.

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO: trabalhos descritivos e interpretativos com base em literatura recente sobre o estado atual de determinado assunto. Os critérios técnicos que deverão ser utilizados são os mesmos definidos para os Artigos de Revisão. Estes trabalhos são também escritos a convite do editor.

COMUNICAÇÃO BREVE: trabalhos originais cuja relevância para o conhecimento de determinado tema justifica a apresentação científica de dados iniciais de pequenas séries ou dados parciais de ensaios clínico-laboratoriais. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/ abstract estruturado (até 200 palavras), palavras-chaves/ keywords (3 a 6 termos), introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RELATO DE CASO: trabalhos com descrição detalhada e análise crítica de casos clínico-laboratoriais atípicos que, pela sua raridade na literatura ou apresentação não usual, merecem uma divulgação e discussão científica. Os relatos de casos deverão conter: título (até 200 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/abstract com contexto e relato contendo descrição, discussão e conclusão (até 200 palavras), introdução, apresentação e relato do caso, discussão, conclusão e referências bibliográficas (até 25 referências). O texto não deverá exceder 3000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

NOTA TÉCNICA: Descrição/validação de instrumentos, métodos e técnicas. Sua estruturação deverá conter: título (até 250 caracteres entre letras e espaço), título corrido (até 40 caracteres entre letras e espaço), resumo/abstract estruturado (até 200 palavras), introdução, metodologia e referências bibliográficas (até 30 referências). O texto ordenado (títulos e subtítulos) não deverá exceder 5000 palavras, excluindo-se tabelas, quadros, figuras e referências.

RESENHA: Revisão crítica de obra recém publicada (até 3 anos), orientando o leitor quanto a suas características e usos potenciais. É fundamental que não se trate apenas de um sumário ou revisão dos capítulos da obra, mas efetivamente uma crítica. Este tipo de contribuição está limitado a 6 páginas, incluindo todos os seus elementos. Não há resumo/abstract.

IMAGENS EM ANÁLISES CLÍNICAS: máximo de duas figuras com qualidade de 300 dpi gravadas em ".jpg" ou ".tif" e até 3 autores e três referências que não deverão ser citadas no texto. As imagens deverão conter título descritivo. O texto deverá conter um máximo de 300 palavras com ênfase na caracterização das figuras. Agradecimentos não deverão ser declarados.

CARTA AO EDITOR: correspondências de conteúdo científico com comentários, discussões ou críticas a artigos recentes (dois números anteriores) publicados na *Revista Brasileira de Análises Clínicas* ou ainda com relatos de pesquisas originais, achados técnico-científicos significativos, opiniões qualificadas sobre um tema específico das análises clínicas, bem como menções ou obituários de personalidades da área da saúde e análises clínicas onde deverá ser destacado seu perfil científico e sua contribuição acadêmica e profissional. Os autores de artigos originais citados por terceiros serão convidados a responder aos comentários e críticas a eles dirigidos. Nesta categoria, o texto tem formato livre, mas não deverá exceder 500 palavras e 5 referências.

EDITORIAIS: escritos a convite do editor, sob tema específico, mas considerando a área de enfoque da *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. Deverão conter um máximo de 2000 palavras e até 10 referências bibliográficas. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

A *Revista Brasileira de Análises Clínicas* avalia manuscritos para publicação em português e inglês. Manuscritos em português devem estar em consonância com a norma culta. A submissão de manuscritos em inglês é **enfaticamente** estimulada pelo Conselho Editorial. Quando neste idioma, recomenda-se a revisão por profissional que tenha o inglês como primeira língua e de preferência, familiarizado com a área do trabalho. O Conselho Editorial, caso considere necessário, poderá enviar os manuscritos submetidos em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos. em inglês para um revisor do idioma, repassando os custos aos autores, após a autorização expressa dos mesmos.

A estrutura geral do manuscrito deverá acompanhar a normalização técnica conforme o quadro abaixo.

ESTRUTURA DOS ARTIGOS	
Português	Inglês
Título Completo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Complete Title <i>Incluir versão em Português</i>
Título Corrido <i>Incluir versão em Inglês</i>	Running Title <i>Incluir versão em Português</i>
Autores	Authors
Resumo <i>Incluir versão em Inglês</i>	Abstract <i>Incluir versão em Português</i>
Palavras-Chave <i>Incluir versão em Inglês</i>	Keywords <i>Incluir versão em Português</i>
Introdução	Introduction
Material e Métodos	Material and Methods
Ética	Ethics
Resultados	Results
Discussão	Discussion
Conclusão	Conclusion
Conflito de interesse	Conflicts of Interests
Suporte Financeiro	Funding Sources
Agradecimentos	Acknowledgements
Referências	References

TÍTULO COMPLETO: Deverá ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho. Recomenda-se iniciar pelo termo que representa o aspecto mais relevante da pesquisa com os demais termos em ordem decrescente de importância. O título não deverá conter nenhuma abreviatura e os nomes das espécies ou palavras em latim deverão vir em letras minúsculas (exceto quando se, quando for o caso, a primeira letra da palavra) e em itálico.

TÍTULO CORRIDO: Deverá ser resumido e conter a ideia central do trabalho.

AUTORES: Os nomes completos dos autores por extenso, graus acadêmicos e filiação institucional deverão ser mencionados. O nome completo, endereço profissional, telefone e e-mail do autor responsável pelo manuscrito deverá ser especificado.

RESUMO: Deverá ser redigido de forma impessoal, bem como ser conciso e claro, pondo em relevo, de forma precisa, os fatos de maior importância encontrados e as conclusões obtidas. Deverá ser elaborado ainda de forma estruturada, contendo introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão e conclusões. Referências não deverão ser citadas e o emprego de acrônimos e abreviaturas deverá ser limitado.

PALAVRAS-CHAVE: Deverão ser indicados termos que permitam a identificação do assunto tratado no trabalho. As palavras-chaves deverão ser extraídas do vocabulário DeCS [Descritores em Ciências da Saúde], elaborado pela Bireme, e/ou MeSH [Medical Subject Headings], elaborado pelo NLM [National Library of Medicine]. Os vocabulários DeCS (<http://decs.bvs.br/>) e MeSH (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>) deverão ser consultados, pois nenhuma outra palavra-chave será aceita.

INTRODUÇÃO: Deverá apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto. Nesta seção, as citações deverão ser restringidas ao mínimo necessário. A introdução não deverá incluir ainda dados ou conclusões do trabalho em referência. O último parágrafo deverá expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do resumo.

MATERIAL E MÉTODOS: Deverão ser apresentados de forma breve, porém suficiente para possibilitar a reprodução e replicação do trabalho. Nesta seção, deverão ser informados o desenho experimental e o material envolvido, bem como deverá ser feita a descrição dos métodos utilizados. Métodos já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, deverão ser referidos apenas por citação. Fontes de reagentes e equipamentos (empresa, cidade, estado e país) deverão ser mencionados. Nomes que são marcas registradas deverão ser também, claramente, indicados. Para melhor leitura e compreensão, subtítulos poderão ser estabelecidos.

ÉTICA: Nesta seção, deverá ser declarado, textualmente, o cumprimento da legislação, quando estudos com seres humanos ou animais forem procedidos. Deverá ser mencionado também a aprovação do Comitê de Ética correspondente da instituição a qual pertencem os autores responsáveis pelos experimentos, inclusive, informando, claramente, o número do parecer. O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não cumpram rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa.

RESULTADOS: Deverão ser apresentados em sequência lógica e com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal e acompanhados de gráficos, tabelas, quadros e ilustrações. Os dados constantes nesses elementos gráficos, no entanto, não deverão ser repetidos integralmente no texto, evitando-se, desse modo, superposições. Apenas as informações mais relevantes deverão ser transcritas e enfatizadas.

DISCUSSÃO: Deverá ficar restrita ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, uma correlação com a literatura da área. Não deverá ser incluída uma revisão geral sobre o assunto. A repetição de resultados ou informações já apresentadas em outras seções, bem como especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos deverão ser evitadas.

CONCLUSÕES: Deverão ser concisas, fundamentadas nos resultados e na discussão, contendo deduções lógicas e correspondentes aos objetivos propostos. Em alguns casos, poderá ser incluída no item discussão, não havendo necessidade de repeti-la em item a parte.

CONFLITOS DE INTERESSE: Deverá ser informada, de maneira explícita, por todos os autores, a existência ou não de conflitos de interesse que podem derivar do trabalho. Não havendo conflitos de interesse, deverá ser escrito "Não há conflitos de interesse".

SUPORTE FINANCEIRO: Deverão ser informados todos os tipos de apoio, fomento ou financiamento obtidos para a realização do projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS: Deverão ser curtos, concisos e restritos àquelas pessoas e/ou instituições que colaboraram com auxílio técnico e/ou recursos. No caso de órgãos de fomento, não deverão ser utilizadas siglas.

TABELAS: O título deverá ser breve e descritivo, apresentando de maneira precisa seu conteúdo e o contexto (ou amostra) a partir do qual a informação foi obtida. Deverá estar ainda inserido na parte superior da ilustração e ser precedido pela palavra "Tabela", seguida por um número identificador em algarismos arábicos. A numeração das tabelas deverá ser feita consecutivamente, a partir da ordem de citação no texto. Serão permitidas notas explicativas

de rodapé (legendas), indicadas por asteriscos e dispostas ao final da tabela. Para notas de rodapé, deverá ser utilizado algarismos romanos. As tabelas deverão ser elaboradas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e em sua parte inferior e sem linhas verticais. Não deverão ser utilizadas também linhas horizontais internas. Os dados das tabelas deverão ser digitados em tamanho 10 e com minúsculas, excetuando-se as letras do início das palavras e as siglas. Nas tabelas, deverá ser empregado espaçamento entrelinhas 1,5, sem qualquer forma de tabulação ou recuos de parágrafos. O comprimento da tabela não deverá exceder 55 linhas, incluindo título, e apresentar largura máxima de 17cm. Os dados apresentados em tabelas não deverão ser repetidos em gráficos. As tabelas deverão ser compostas em programa Word ou MS-Excel e enviadas em arquivo separado. Deverá ser evitado um número excessivo de tabelas.

FIGURAS: Todas as ilustrações que não se enquadram no conceito de tabela são consideradas figuras, portanto: quadros, gráficos, desenhos, imagens e fotografias. Deverão ter um título breve e descritivo, disposto em sua parte inferior. Deverão ainda ser numeradas com algarismos arábicos, consecutivamente, na ordem de aparecimento no texto e citadas como figuras. As figuras deverão ter boa resolução (mínimo de 300 dpi), ser gravadas em formato ".jpg" ou ".tif" e medir no mínimo 12 x 17cm e no máximo 20 x 25cm. As escalas deverão ser indicadas por uma linha ou barra na figura e referenciadas, se necessário, na legenda. Os gráficos deverão ser preparados nos programas Microsoft Word ou MS-Excel em formato ".doc", ".docx" ou ".xls" e não como imagem. Imagens produzidas em software estatístico devem ser convertidas para formato MS-Excel, caso não seja possível converter para formato ".tif". Ilustrações coloridas somente poderão ser aceitas se os autores assumirem os custos. Os dados apresentados nas figuras não deverão repetir aqueles já descritos nas tabelas. Os locais aproximados onde as ilustrações serão colocadas deverão ser determinados no texto. As figuras deverão ser enviadas em arquivos separados. Não deverão ser enviados um número excessivo de figuras.

REFERÊNCIAS: As referências, em todas as categorias de trabalho científico, deverão ser normalizadas de acordo com o estilo Vancouver publicado em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* [Normas para Uniformização de Manuscritos Submetidos às Revistas Biomédicas] pelo *International Committee of Medical Journal Editors [ICMJE]* (<http://www.icmje.org>) e que pode ser consultado em www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3566414/ (Versão em Português) ou em www.icmje.org/urm_full.pdf (Versão em Inglês). A abreviação dos títulos dos periódicos deverá seguir o recomendado em *List of Journals Indexed in Index Medicus [National Library For Medicine]* (<http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>) ou no Portal de Revistas Científicas em Ciências da Saúde [Biblioteca Virtual em Saúde] (<http://portal.revistas.bvs.br/index.php?lang=pt>). Sugere-se incluir aquelas referências estritamente pertinentes à problemática abordada e evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. **A lista das referências deverá ser numerada de acordo com a ordem em que os autores foram citados no texto e não em ordem alfabética.** Deverão ser listados somente os trabalhos consultados e citados no texto. Citações de "resumo", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionados no texto, mas não serão aceitos como referências bibliográficas. A exatidão das referências será de responsabilidade exclusiva dos autores.

As citações e menções no texto de informações colhidas em outras fontes, bem como as referências bibliográficas deverão seguir o exposto abaixo:

TEXTO: Deverá ser utilizado em todo o manuscrito o Sistema de Chama-da Numérico. Neste sistema, as citações dos documentos deverão ter numeração única e consecutiva, indicada pelo número da referência em expoente e entre parênteses. Os autores serão numerados por ordem de sua citação no texto, independentemente da ordem alfabética. As referências citadas em legendas de tabelas e figuras deverão manter a sequência com as referências citadas no texto. O mesmo trabalho mencionado mais de uma vez deverá manter, sempre que aparecer, o primeiro número a ele atribuído.

Observações Gerais:

- Quando houver dois autores, deverá ser utilizada a partícula "e" entre os sobrenomes;
 - Quando houver 3 ou mais autores, deverá ser indicado apenas o primeiro sobrenome seguido da expressão latina "et al.";
 - Quando uma entidade, corporação, editores ou projetos editoriais assumirem a responsabilidade integral pelo documento deverão ser indicados/ tratados como autores;
 - Nomes contendo mais de um sobrenome deverão ser indicado o último sobrenome, sem partículas de ligação como "de" ou "da";
 - Sobrenomes duplos, com hífens ou apóstrofes ou que formem uma expressão deverão ser indicados em seu conjunto;
 - Termos relacionados a graus de parentesco (filho, júnior, neto, sobrinho), deverão ser indicados após os sobrenomes e por extenso.
- Alguns exemplos de citações:
- **Um/duos autores:** No mesmo ano, Nishimura e Miyaji⁽²⁶⁾ mudaram a denominação do fungo para *Hortaea werneckii*, em homenagem a Parreiras Horta.

- **Mais de dois autores:** Giannopoulos et al.⁽³²⁾ também observaram maior prevalência de NIC 1 em mulheres na faixa etária de 20 a 30 anos enquanto NIC 3 foi mais frequente em mulheres com mais de 50 anos.

- **Autores corporativos:** De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabete,⁽¹⁷⁾ os sinais e sintomas de hiperglicemia incluem: polidipsia, poliúria, perda de peso, fome exagerada, visão embaçada, infecções repetidas na pele e mucosas, dificuldade na cicatrização de ferimentos, fadiga e dores nas pernas (má circulação).

- **Editores/ Projetos editoriais:** Conforme o Dicionário de Especialidades Farmacêuticas,⁽⁵⁾ a meia-vida inicial da anfotericina B é de 24-48 horas e sua meia-vida terminal é de 15 dias.

- **Sem indicação de nome de autor:** O diagnóstico de hipertireoidismo, por sua vez, é dado a partir de resultados baixos de T4 livre e elevados de TSH.⁽¹⁴⁾

AUTORES: Os autores deverão ser referenciados por seu sobrenome, tendo apenas a primeira letra em maiúscula, seguido do(s) nome(s) abreviado(s) e sem vírgulas e pontos. **Todos os autores** deverão ser referenciados e separados por vírgulas (o mesmo é válido para livros), apesar do estilo Vancouver recomendar que apenas sejam indicados os 6 primeiros autores, quando o número de autores for maior. Deverão ser dados espaços após as vírgulas.

Observações Gerais:

- Quando o documento consultado possuir apenas editores ou compiladores, esta condição deverá ser indicada logo após os nomes dos autores;
- Quando a autoria do documento for de uma organização, a referência deverá ser iniciada diretamente pelo nome da entidade. Se houver mais de uma entidade com subordinação entre elas, estas deverão entrar em ordem decrescente de hierarquia e serem separadas por pontos. Se as entidades não apresentarem subordinação, estas deverão ser separadas por ponto e vírgula;
- Quando o documento consultado não possuir autoria, a referência deverá ser iniciada por seu título;
- Quando o documento consultado for tese, dissertação ou monografia deverá ser empregada a seguinte correspondência entre tipo e grau: tese: doutorado, tese: livre-docência, tese: PhD, dissertação: mestrado, monografia: especialização, monografia: graduação;
- Quando o documento consultado for de natureza jurídica (Constituição Federal ou Estadual, Emenda Constitucional, Medida Provisória, Leis, Decretos, Portarias, Resoluções e Códigos), deverão ser seguidos os padrões de autoria/ emissão recomendados pela NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT, 2002), com a apresentação gráfica adaptada ao estilo de Vancouver.

- Toda informação adicionada à referência que for encontrada em alguma fonte que não o documento consultado ou informação complementar à referência como suporte do documento ou tradução de alguma expressão deve ser adicionada entre [colchetes].

TÍTULO DE ARTIGOS/ DOCUMENTOS: Os títulos dos artigos/ documentos consultados deverão ser referenciados em letras minúsculas, no entanto, a primeira palavra deverá ser iniciada por letra maiúscula. O texto do título não deverá vir nem em negrito e nem em itálico e deverá ser finalizado por ponto.

TÍTULO DE PERIÓDICOS/ REVISTAS E ANO: Os títulos de periódicos/ revistas consultados deverão ser referenciados abreviados e finalizados com ponto. Importante considerar que todos os pontos da abreviatura do título deverão ser eliminados, com exceção do último, empregado para separar o título do ano. Um espaço deverá ser dado entre o ponto colocado ao final do título e o ano. A separação entre ano e volume deverá ser feita com a utilização de ponto e vírgula.

MÊS, VOLUME, NÚMERO E PÁGINAS: O estilo Vancouver recomenda que os meses sejam referenciados em inglês e de forma abreviada, independente da língua do texto: *Jan, Feb, Mar, Apr, May, Jun, Jul, Aug, Sep, Oct, Nov, Dec*. No entanto, a RBAC aceita a abreviação em português daqueles manuscritos nesse idioma. Quando o periódico apresentar paginação contínua ao longo de um volume, o mês e o número poderão ser omitidos. Ano, volume, número e páginas deverão ser escritos sem qualquer espaço entre eles. Quando as páginas do artigo consultado exibirem números coincidentes, deverão ser eliminados os números iguais (445-449, utilizar: 445-9).

EDIÇÃO E LOCAL DE PUBLICAÇÃO: As edições de documentos consultados deverão ser referenciadas após o título, em algarismos arábicos, seguidas de ponto e da palavra "edição" no idioma que figura na publicação original e de forma abreviada. Quando for a primeira edição, essa não deverá ser indicada. Quando houver a definição do local de publicação, este deverá ser indicado em seguida à edição.

PARÁGRAFOS: Quando a referência ocupar mais de uma linha, esta deverá ser reiniciada na primeira posição na linha inferior, sem recuos.

Alguns exemplos de referências:

Periódicos:

- **Um Autor:** Marques SA. Paracoccidiodomycosis. *Clin Dermatol*. 2012 Nov;30(6):610-5.
- **Mais de um autor:** Lee MY, Telisinghe PU, Ramasamy R. Cervical cancer in Brunei Darussalam. *Singapore Med J*. 2012 Sep;53(9):604-7.
- **Até seis autores:** Okita Y, Narita Y, Miyakita Y, Ohno M, Nagai S, Shibui

S. Management of cytomegalovirus infection in a patient with malignant glioma treated with temozolomide and steroids. *Intern Med.* 2012;51(20):2967-71.

• **Mais de seis autores:** Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Nov;56(11):5898-906.

• **Autores pessoais e corporativos:** Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, et al; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis.* 2012;16(3):205-42.

• **Volume com suplemento:** Maljaars J, Peters HP, Masclee AM. The gastrointestinal tract: neuroendocrine regulation of satiety and food intake. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Dec;26 Suppl 2:241-50.

• **Número com suplemento:** Komrokji RS, Verstovsek S, Padron E, List AF. Advances in the management of myelofibrosis. *Cancer Control.* 2012; 19(4 Suppl):4-15.

• **Editorial com indicação de autoria:** Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma [editorial]. *Allergol Int.* 2012;61(3):351-2.

• **Editorial sem indicação de título:** Bartels PD. Editorial. *Ugeskr Laeger.* 2012;174(42):2518.

• **Artigo/ Editorial sem indicação de autoria:** Improved and Emerging Gel-free Separation and Detection Methods for Proteomics [editorial]. *Proteomics.* 2012;12(19-20):2902-3.

• **Carta ao editor:** Dettkenkofer M, Conrad A. Hand hygiene prevents MRSA transmission [letter]. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107(8):139.

• **Artigo com DOI:** Newman TB, Pletcher MJ, Hulley SB. Overly aggressive new guidelines for lipid screening in children: evidence of a broken process. *Pediatrics.* 2012 Aug;130(2):349-52. doi: 10.1542/peds.2012-0481.

• **Autor corporativo:** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multistate outbreak of fungal infection associated with injection of methylprednisolone acetate solution from a single compounding pharmacy - United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012 Oct 19;61:839-42.

Livros:

• **Um autor/ mais de um autor:** Stockham SL, Scott MA. *Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2011.

• **Autor de obra e de capítulo:** Rey L. *Bases da parasitologia médica.* 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

• **Capítulo:** Rodrigues RMMS, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica. In: Almeida-Muradian LB, Camargo Penteado MV. *Vigilância Sanitária: tópicos sobre legislação e análise de alimentos.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2007. p. 72-80.

• **Responsabilidade intelectual destacada:** Diniz D, Sugai A, Guilhem D, Squinca F, organizadores. *Ética em pesquisa: temas globais.* Brasília: Editora UNB; 2008.

Teses, Dissertações e Monografias:

• **Autor e indicação de grau:** Maranhão FCA. Análise da expressão gênica no dermatófito *Trichophyton rubrum* mimetizando a infecção in vitro: pH e diferentes fontes de carbono regulando genes. São Paulo. Tese [Doutorado em Genética] – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; 2008.

Eventos Científicos:

• **Anais com indicação de título:** Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007.

• **Anais com indicação de autoria, trabalho e título:** Neufeld PM, Melhem M, Szescs MW, Santos LH, Dornelas-Ribeiro M, Maia S, et al. Espécies de *Candida* isoladas de pacientes leucêmicos. In: Anais do 5. Congresso Brasileiro de Micologia; 2007 nov. 12-16; Recife, Brasil. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia; 2007. p. 314.

Órgãos/ Instituições:

• **Um autor corporativo:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes.* Brasília: Ministério da Saúde; 2002.

• **Mais de um autor corporativo:** Fundação Oswaldo Cruz; Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. *Relatório de atividades:* 2006. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2007.

Referências Legislativas:

• **Leis:** Brasil. Lei no. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 20 set 1990; seção 1.

• **Decretos:** Brasil. Decreto no. 7.580, de 28 de junho de 2011. Regulamenta a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a organização do Sistema Único de Saúde - SUS, o planejamento da saúde, a assistência à saúde e a articulação interfederativa, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 29 jun 2011; seção 1.

• **Portarias:** Ministério da Saúde (Brasil). Portaria no. 2.616, de 12 de maio de 1998. Expede diretrizes e normas para a prevenção e o controle da infecção hospitalar. *Diário Oficial da União* 13 mai 1998; seção 1.

• **Resoluções:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para Funcionamento de Laboratórios Clínicos. *Diário Oficial da União* 14 out 2005; seção 1.

Meios Eletrônicos:

• **Periódicos:** Mondelli AL, Niêro-Melo L, Bagagli E, Camargo CH, Bruder-Nascimento A, Sugizaki MF, Carneiro MV, Villas Boas PJF. *Candida* spp.: manual identification (reference method) and automated identification (Vitek system platform). *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* [periódicos na internet]. 2012 set [acesso em 29 de out 2012]; 18(3). Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v18n3/a11v18n3.pdf>.

• **Referências legislativas:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). RDC no. 306, de 13 de dezembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de saúde [resolução RDC na internet]. *Diário Oficial da União* 10 dez 2004 [acesso em 28 out 2012]. Disponível em: <http://www.unesp.br/pgp/pdf/rdc30604anvisa.pdf>.

• **Eventos Científicos:** Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brigido MM, Felipe MSS, Silva-Pereira I. Identification and Characterization of Phase-Specific cDNAs Encoding for Two Hydrophobins in the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. In: 4o. Congresso Virtual de Micologia de Hongos Patógenos em América Latina [evento na internet]. 2003 27jun-14jul; Caracas, Venezuela [acesso em 10 jul 2003]. Disponível em: <http://congresomicologia.ucv.ve>.

A tramitação de manuscritos será feita exclusivamente online pelo **Sistema de Gestão de Publicações (SGP)**, no endereço: www.sgponline.com.br/rbac/sgp. Outras formas de submissão, não serão aceitas.

Observações Gerais:

• A comunicação entre os diferentes participantes do processo editorial de avaliação e publicação (autores, revisores e editor) será feita apenas de forma eletrônica pelo SGP, sendo o autor responsável pelo manuscrito informado automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status;

• Apenas o autor responsável pelo manuscrito deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema e posterior acesso por meio de *login* e senha;

• A RBAC comunicará individualmente, por e-mail, a cada autor a sua participação no manuscrito. Caso um dos autores não concorde com sua participação, o manuscrito será recusado;

• O SGP atribuirá a cada manuscrito um número de registro e o autor principal será notificado de que o manuscrito está completo e apropriado para iniciar o processo de revisão;

• Pedidos de *fast-track* poderão ser considerados desde que justificados e solicitados por orientadores e/ou coordenadores de programas de pós-graduação ou responsáveis por departamentos, laboratórios, setores ou serviços de instituições públicas ou privadas ou ainda se rigorosamente fundamentados por seus autores. Os pedidos de *fast-track* deverão vir endereçados ao editor da RBAC em documento em papel timbrado da instituição e carimbado por seus superiores hierárquicos.

MODELO DE DECLARAÇÃO

Declaração de Responsabilidade, Conflitos de Interesse, Concordância e Transmissão de Direitos Autorais

Os autores abaixo assinados vimos submeter o artigo intitulado "Título do Artigo" à apreciação do Corpo Editorial da *Revista Brasileira de Análises Clínicas* - RBAC para sua publicação. Nesta oportunidade, declaramos estar de acordo com que os direitos autorais referentes ao artigo em tela tornem-se propriedade exclusiva da RBAC desde sua submissão, sendo vedada a reprodução total ou parcial, em qualquer meio de divulgação, sem que a prévia e necessária autorização seja solicitada e concedida pela editoria da RBAC. Declaramos também que o artigo não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros e que seu conteúdo é de inteira responsabilidade dos autores. Declaramos ainda que este é um trabalho original e que não foi publicado anteriormente e nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, tanto no formato impresso quanto no eletrônico. Os autores confirmam estar cientes e concordantes com a publicação do artigo na RBAC e afirmam não haver qualquer tipo de conflito de interesse do tema abordado no artigo com pessoas, entidades ou instituições.

Nomes dos autores e assinaturas:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Data: ____/____/____.