



RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical Analyses

A Tempestade “*in vitro*”

O Diagnóstico de uma Pandemia

EDIÇÃO ESPECIAL

Volume 53 - Nº 02 | Ano 2021

Editor-chefe/Editor-in-Chief

Paulo Murillo Neufeld (RJ)

Editor Emérito/Honorary EditorMateus Mandu de Souza (RJ) - *in memoriam***Editores Associados/Associate Editors**Lenilza Mattos Lima (SC)
Mauren Isfer Anghebem (PR)**RBAC**
Revista Brasileira de Análises Clínicas
Brazilian Journal of Clinical AnalysesPublicação oficial da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC
Official Publication of Brazilian Society of Clinical Analyses

Volume 53 - Número 2 - 2021

Edição online - ISSN 2448-3877

Produção Editorial/Publisher

Editorarte Projetos de Comunicação e Editora Ltda.

**DIRETORIA EXECUTIVA/EXECUTIVE BOARD**Luiz Fernando Barcelos (RS)
Presidente/PresidentMaria Elizabeth Menezes (SC)
Vice-Presidente/Vice-PresidentLenira da Silva Costa (RN)
Secretária-Geral/General SecretaryMauren Isfer Anghebem (PR)
Secretária/SecretaryAndré Valpassos Pacifici Guimarães (RJ)
Tesoureiro/TreasurerPaulo 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
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), 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**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),
Gabriel de Souza Lima Oliveira (SP)**Endocrinologia/Endocrinology**

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

Toxicologia/ToxicologyRegina Helena Queiroz (SP), Maria da Graça Almeida
(RN)**Microbiologia Clínica/Clinical Microbiology**Antônio Márcio Lopes (MG), Estevão José Colnago (RJ),
Amauri Braga Simonetti (RS), Cássia Maria Zoccoli (SC),
Carmen Paz Oplusti (SP), Raissa Mayer R. Catão (PB)**Imunologia Clínica/Clinical Immunology**Paulo Jaconi Saraiva (RS), Antônio Walter Ferreira
(SP), Sílvia Fernandes R. da Silva (CE), Manuela Berto
Pucca (SP)**Parasitologia Clínica/Clinical Parasitology**Antônio Pedro Soares (MG), 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 Ávila 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:
Mauren Isfer Anghebem (PR)
Membros/Members: Luiz Fernando Barcelos (RS)**Ensino/Education**

Paulo Murillo Neufeld (RJ), Marcos Kneip Fleury (RJ)

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

Sumário/Contents

CARTA DO PRESIDENTE / PRESIDENT LETTER

- 104** A pandemia de COVID-19 e os desafios futuros
The COVID-19 pandemic and the future challenges
Luiz Fernando Barcelos

EDITORIAL / EDITORIAL

- 105** A bioética laboratorial e a pandemia de COVID-19
Laboratorial bioethics and COVID-10 pandemic
Neufeld PM

ARTIGOS / ARTICLE

- 109** Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil
Main SARS-CoV-2 variants notified in Brazil
Michelon CM
- 117** Micosis en tiempos de COVID-19
Mycosis in times of COVID-19
Zaror L, Aravena A, Valenzuela A
- 127** Imunomodulação causada por parasitoses oportunistas em casos de COVID-19: um breve estudo
Immunomodulation caused by opportunistic parasites in COVID-19 cases: a brief report
Silva LOP, Nogueira JMR
- 131** Avaliação fármaco-toxicológica do emprego de N-acetilcisteína no manejo da COVID-19
Pharmacological and toxicological evaluation of the N-acetylcysteine in clinical management of COVID-19
Carvalho MGO, Carvalho VM
- 138** Uso da citometria de fluxo no diagnóstico sorológico da COVID-19
The use of flow cytometry for the serological diagnosis of COVID-19
Zattoni IF, Picheth G, Rego FGM, Anghebem MI, Moure VR, Valdameri G
- 143** Vacinação em mulheres gestantes, puérperas e lactantes
Vaccination in pregnant, puerperal and lactating women
Martins MSF, Freitas SLS, Martins CSF
- 148** Alterações laboratoriais em gestantes e puérperas com diagnóstico confirmatório de COVID-19
Laboratory test alterations in pregnant and puerperal women diagnosed with COVID-19
Albuquerque JSA, Neto JNFG, Dias HI, Brizeno MO, Neto FCS, Timbó FJM, Pereira JM
- 155** Acurácia diagnóstica dos métodos sorológicos de detecção da COVID-19
Diagnostic accuracy of serological methods for detecting COVID-19
Martinello F

Sumário/Contents

- 163** COVID-19 Associada à Aspergilose Pulmonar (CAPA): uma revisão sistemática
COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA): A systematic review
Araujo EM, Lima-Neto RG
- 167** Prevalência de infecção pelo SARS-CoV-2 em profissionais de saúde em um Hospital Universitário no Rio de Janeiro durante a pandemia de COVID-19 em 2020
Prevalence of SARS-CoV-2 infection in healthcare professionals at a University Hospital in Rio de Janeiro during the COVID-19 pandemic in 2020
Gonzalez MFSR, Carvalho RS, Rangel IC, Menezes P, Azevedo BP, Ferry FRA
- 175** Alternative workflow for COVID-19 diagnosis using direct RT-PCR screening
Fluxo de trabalho alternativo para diagnóstico da COVID-19 utilizando triagem por RT-PCR direta
Pessoa WFB, Galvão BHA, Barroso H, Sousa ESS, Campana EH, Cavalcante MGS, Dejana NN, Perez VP
- 180** Hemácias pinçadas ou em forma de cogumelo em um paciente acometido por COVID-19
Pincer cells or mushroom-shaped red blood cells in a patient affected by COVID-19
Dienstmann G, Santos VB, Comar SM

CARTA AO EDITOR/LETTER TO EDITOR

- 183** Tecnologia do DNA Recombinante
Recombinant DNA Technology
Menezes ME
- 185** Uso indiscriminado de antibióticos durante a pandemia: o aumento da resistência bacteriana pós-COVID-19
Indiscriminate use of antibiotics during the pandemic: increasing in post-COVID-19 bacterial resistance
Silva LOP, Nogueira JMR
- 187** O impacto da COVID-19 na malária
The impact of COVID-19 on malaria
Machado RLD
- 192** Qual é o real impacto de resultados falsos negativos no diagnóstico da COVID-19?
What is the actual impact of false-negative results on COVID-19 diagnosis?
Marmol CHC

193 INSTRUÇÕES AOS AUTORES / INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

A pandemia de COVID-19 e os desafios futuros

The COVID-19 pandemic and the future challenges

Nesta época, começamos a fazer retrospectivas sobre o que ocorreu no ano, avaliando as coincidências e as divergências em relação as previsões iniciais fazendo um balanço entre acertos e erros. Neste ano assim como no ano anterior, esta prática tem demonstrado diferenças significativas porque as previsões não se cumpriram quase na sua totalidade.

Quem poderia no início do ano passado imaginar que teríamos um novo coronavírus para nos assustar causando uma doença que se transformou em pandemia atingindo países com muitos recursos financeiros e também países com cultura sofisticada.

A SBAC, sempre vigilante, criou, então, no primeiro semestre de 2020, uma Aba em seu site denominada de COVID-19, assim como lançou uma edição especial da RBAC totalmente dedicada à COVID-19 no segundo semestre.

Diante da imensa procura resolvemos então lançar este segundo número identificado como volume 53 - número 2 – 2021 – COVID-19, com 16 artigos de conteúdo primoroso.

Esperamos, com isto, atender a comunidade científica com informações atuais e relevantes.

Esta pandemia será vencida e a doença controlada, é a nossa esperança. E então a crise sanitária ficará reduzida, mas teremos que conviver com a extensão da crise financeira devido às sequelas graves atingindo a economia de todos os países. A recuperação será lenta, mas ao mesmo tempo deverá encontrar formas para a correção dos erros que ficaram evidentes no modelo social e de negócios até então utilizado.

Ainda temos muitas dúvidas desafiando o conhecimento científico sobre as doenças infecciosas devido ao comportamento deste vírus e a sua resposta imunológica ocorrendo diferentemente dos padrões esperados. Relatos mostram que muitas vezes a detecção do vírus permanece por um período superior ao esperado assim como a detecção dos anticorpos, as vezes antes do esperado e também após um tempo muito superior ao previsto.

A pandemia está antecipando muitas inovações e os Laboratórios Clínicos devem estar preparados para absorvê-las e incorporá-las em sua rotina.

A ciência promoveu uma verdadeira revolução laboratorial a partir da tecnologia do “DNA recombinante” trazendo para a saúde pública e a sociedade em geral, a possibilidade de exames laboratoriais de grande qualidade e em tempo recorde.

Aparentemente estamos num período de estabilização da doença no país e no mundo com algumas variações entre os estados e países e de forma alternada. Esperamos que mantenha um declínio otimista e com certeza já estamos nos sentindo mais seguros com o avanço da vacinação.

Enfim estamos próximos de mais um final de ano, mas não de um ano qualquer, mas do ano em que assim como no ano anterior, a sociedade enfrentou sérios prejuízos e a economia ficou extremamente abalada.

Vamos aguardar ansiosamente que a normalidade retorne, certamente em outro patamar, para que possamos desenvolver as nossas atividades e projetos, muitos deles aguardando este novo cenário.

Luiz Fernando Barcelos

Presidente da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

A bioética laboratorial e a pandemia de COVID-19

Laboratorial bioethics and COVID-10 pandemic

Desde a antiguidade, o homem tem demonstrado preocupação com as condutas e atitudes dos profissionais de saúde no que concerne à proteção da vida. Na longínqua Babilônia, foi elaborado o conhecido Código de Hammurabi, considerado o código jurídico mais antigo já descoberto pela arqueologia, remontando ano de 1.780 a.C. Esse código, além de regular e ordenar as relações sociais e de propriedade, legislava sobre diversas situações concretas e pontuais como as relações médico-paciente. O Código de Hammurabi estabelecia os limites dos direitos e deveres dos profissionais de saúde, o pagamento pelos bons serviços e as punições para a má prática médica, conjoindo a boa medicina ao bom resultado de sua intervenção.⁽¹⁾ A Torá judaica, escrita por volta de 1.200 a.C., também pode ser considerada como um outro antigo código que exorta a proteção à vida ao proclamar em seu Quinto Mandamento “Não Matarás” e ao apresentar diversas práticas médicas que tinham como objetivo a preservação ou a recuperação da saúde da população.^(1,2) Por fim, a locução latina *Primum non Nocere* (Primeiro não Prejudicar), atribuída a Hipócrates de Cos (460 a.C. – 377 a.C.), é outra antiga referência à indispensável prevenção de riscos e danos irredimíveis aos pacientes.⁽²⁾

Na atualidade, a preocupação com a vida passou a compor uma nova ciência, denominada bioética, cujo escopo é estudar de forma sistemática a conduta humana no campo da biologia e da atenção à saúde, tendo como base valores e princípios éticos. Todavia, com os avanços da ciência e da tecnologia, a bioética tem estendido seu campo de ação a toda atividade humana que impacta a vida, incluindo a natureza e os animais.⁽¹⁾ Essa ciência tem como ferramenta de trabalho a ética filosófica e seus próprios princípios bioéticos (autonomia, justiça, beneficência, não-maleficência e solidariedade), que tradicionalmente têm sido assim enumerados:^(1,3)

- A autonomia é um princípio que emana do conceito de liberdade do indivíduo em todas as circunstâncias vitais. Esse princípio refere-se ao direito do paciente de participar na tomada de decisão em relação à realização de exames laboratoriais e à escolha do tratamento ou acerca de qualquer prática médica que lhe seja proposta. Decorre do princípio de autonomia o Consentimento Livre e Esclarecido.
- A justiça é um princípio que apresenta duas vertentes: a distributiva, que incorpora a destinação equitativa dos recursos materiais e financeiros, e aquela relacionada à igualdade de tratamento, não discriminação ou não exclusão de grupos ou pessoas.
- A beneficência reitera a obrigação moral do profissional e das equipes de saúde de agirem sempre em prol e pelo bem do paciente.
- A não-maleficência está associada à não produção de danos e/ ou a sua prevenção, estando contido nesse princípio não matar, não provocar dor ou sofrimento e não produzir incapacidades.
- O princípio da solidariedade, incorporado mais recentemente, se articula com propostas relacionadas à dignidade do ser humano e o respeito à sua vulnerabilidade, tendo grande interface com os princípios da justiça/ equidade e autonomia.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102188

Nesse contexto de pandemia, onde o Coronavírus se transformou em um ente perturbador do bem comum e da dignidade humana, produzindo uma realidade danosa à saúde coletiva (física e psicológica), à vida cotidiana e à economia, comprometendo o presente e o futuro das pessoas e das sociedades, a bioética, a partir de seus princípios, surge como um importante instrumento de mitigação dos efeitos maléficos da COVID-19 pela salvaguarda dos direitos humanos profundamente corroídos pela crise sanitária que tem sido experimentada pela humanidade.^(4,5)

Na linha de frente desse combate estão os profissionais de saúde que frequentemente têm que tomar decisões céleres e com elevado grau de complexidade em ambientes escassos de recursos de toda natureza.⁽⁶⁾ Tais decisões, contudo, não podem ferir o respeito à vida e à promoção da saúde, bem como devem permitir o desenvolvimento de outros bens e benefícios aos pacientes. Importa reiterar que reflexões bioéticas sobre a prevenção, a cura e o cuidado às pessoas afetadas por esta pandemia devem ser o fio condutor das deliberações médicas e laboratoriais nas diversas especialidades da medicina. Essas reflexões ajudam ainda a ordenar e a colocar os valores e a ética profissional acima dos interesses pessoais ou institucionais.^(6,7)

No âmbito das análises clínicas, um diagnóstico rápido e preciso dos casos de COVID-19 é fundamental para identificar, isolar e tratar os pacientes infectados.⁽⁸⁾ Diferentes técnicas estão disponíveis e a implementação de cada uma delas depende do que se desejar investigar e avaliar. No entanto, a despeito da técnica escolhida, elementos éticos deverão ser também considerados na atividade laboratorial a fim de suprimir ao máximo qualquer prejuízo que possa ser causado ao paciente.^(8,9)

Dentre a multiplicidade de elementos éticos e metodológicos que devem ser contemplados por um laboratório de análises clínicas envolvido no trabalho de apoio diagnóstico da infecção pelo Coronavírus, podem ser considerados:^(8,3,1)

- **Autonomia:** A confidencialidade de dados e a privacidade dos pacientes devem ser protegidas. Nesse caso, há uma exigência moral de respeitar a autonomia do paciente, a sua liberdade de escolha, a proteção de informação privada ou o acesso ao seu corpo.
- **Beneficência:** Os exames laboratoriais devem estar orientados para o benefício do paciente e com fins diagnósticos. Nessa situação, há uma obrigação em se fazer todo o esforço em prol do paciente, atuando de maneira a ajudar na melhoria ou recuperação de sua saúde.
- **Não-Maleficência:** Tecnologias ou procedimentos que possam produzir algum dano ao paciente não devem ser empregados. Nesse caso, há uma preocupação em não infligir dano ao paciente de forma intencional.
- **Não-Maleficência:** Processos automatizados devem ser preferencialmente utilizados a fim de minimizar os erros e aumentar a celeridade diagnóstica. Nessa situação, procura-se evitar demoras na instituição do tratamento com prejuízos à saúde do paciente.
- **Não-Maleficência:** As limitações das técnicas de diagnóstico laboratorial empregadas devem ser conhecidas e previstas. Nesse contexto, tenciona-se evitar equívocos de diagnóstico provocando danos ao paciente.
- **Beneficência:** O treinamento, a qualificação e a atualização de todo o corpo técnico do laboratório deve ser permanente. Essa ação consiste na prática do bem ou na virtude de beneficiar o paciente através do melhor desempenho profissional.
- **Não-Maleficência:** O manejo de pacientes e das amostras biológicas deve ser procedido empregando-se todas as medidas de biossegurança requeridas. Nesse caso, considera-se atendido o clássico conceito desse princípio “não causar dano e minimizar prejuízos”.
- **Beneficência:** A solicitação de exames laboratoriais deve ser feita preferencialmente para subsidiar decisões terapêuticas. Essa situação solicita que o profis-

sional de saúde tenha a maior convicção e a melhor informação técnica possível para assegurar que ato [solicitação] seja efetivamente benéfico ao paciente.

- **Justiça/Solidariedade:** A obtenção da amostra clínica deve ser realizada seguindo as normas de segurança biológica, com adequada técnica e no correto período de tempo de evolução da doença. Nesse caso, tem-se a preocupação de se evitar a realização de um exame laboratorial em período clínico equivocado, o que pode produzir um resultado falso negativo e determinar desperdício dos escassos recursos públicos.
- **Não-Maleficência:** O transporte da amostra clínica até o laboratório deve ocorrer com o emprego dos protocolos de segurança biológica e no menor tempo de deslocamento possível. Nesse caso, procura-se evitar a perda de qualidade da amostra, o que pode trazer prejuízos ao correto diagnóstico laboratorial e à saúde do paciente.
- **Não-Maleficência:** A interpretação dos resultados obtidos deve ser realizada com prudência dentro do contexto clínico. Nessa situação, procura-se minimizar os erros de leitura dos resultados para se evitar a produção de diagnósticos inconclusivos e atrasos na instituição do tratamento do paciente.
- **Justiça/Solidariedade:** Não é justificada a realização de exames laboratoriais que não apresentem a sensibilidade requerida ou que não acrescentem novas informações sobre o quadro clínico do paciente. Nesse contexto, procura-se evitar desperdícios dos limitados recursos públicos.
- **Justiça/Solidariedade:** A repetição de um exame laboratorial deve considerar o curso natural da virose. Nesse contexto, tenciona-se prevenir desperdícios dos exíguos recursos públicos.
- **Autonomia/Solidariedade:** O resultado obtido deve ser informado ao paciente em termos claros e compreensíveis. Nessa situação, procura-se respeitar o estado de vulnerabilidade do paciente e reconhecer seu valor.
- **Não-Maleficência:** As amostras sob custódia do laboratório devem permanecer em local seguro e de acesso restrito. Nesse caso, tem-se como objetivo a prevenção da contaminação de profissionais de saúde e pacientes.

O laboratório clínico é uma importante ferramenta de combate e controle à pandemia de COVID-19, apresentando, inclusive, posição estratégica nos sistemas sanitários nacionais.⁽⁷⁾ Para fazer frente ao estado de exceção vivido na atualidade pela população mundial, além da indispensável competência técnica, tem sido verificada a necessidade de incorporação dos princípios bioéticos na atividade de laboratório, em decorrência dos dilemas morais que surgiram com a pandemia, principalmente aqueles relacionados à perda temporária de direitos no âmbito social, da assistência sanitária, da saúde pública, da investigação em saúde e das políticas sócio-sanitárias e econômicas.^(2,6) Como cada fase do processo analítico tem aspectos éticos característicos que devem ser considerados para o estabelecimento de uma prática diagnóstica onde haja a proteção daqueles pacientes vulnerabilizados pela pandemia, a discussão e reflexão acerca da bioética laboratorial e da aplicação de seus princípios é inescapável nesse momento histórico da saúde pública.^(4,6,10)

REFERÊNCIAS

1. Padovani-Cantón, AM, Clemente-Rodríguez, ME. ¿Qué es la biética? Rev Ciencias Médicas de Pina del Río. 2010; 14(1).
2. Jerónimo J, Orozco, LT, Reynaud, AC. Bioética na prática de la colposcopia. Ver Perú Ginecol Obstet. 2021; 67(2).
3. Giordano A, Canale, A, Pontet J, Reyes N, Cacciatori A, Correa H, Núñez LA. Recomendaciones de la Sociedad Uruguaya de Medicina Intensiva sobre los aspectos bioéticos en la pandemia COVID-19. Rev Med Urug. 2021; 37(1): e37111.

4. Capella VB. Bioética, derechos humanos y COVID-19. Cuad Bioética. 2020; 31(102): 167-182.
5. Pastor LM. COVID-19 y Bioética. Cuad Bioética. 2020; 31(102): 131-138.
6. Pérez-Conforme HG, Pincay-Muñoz, NG, Pinela-Torres, MN, Rodríguez-Parrales, DH. La ética: influye de forma positiva o negativa en el trabajo de laboratorio clínico. Dom. Cien. 2021; 7(5): 233-247.
7. Campo-Avilés JA. La ética en el laboratorio clínico. CCM de Holguín. 2013; 17(1):84-7.
8. Birnenbaum SJ. Las pruebas de laboratorio em tiempo de pandemia. Vida y Etica. 2020; 21 (2): 1-5.
9. Rodríguez Pérez, LM. Apuntes éticos y bioéticos a considerar la etapa pre analítica del laboratorio clínico. Rev Cub Med Desp Cult Fis. 2019, 14(3): e-47.
10. Román-Collazo CA, Hernandez-Rodríguez YC, Álvarez-Ochoa RI, Andrade-Campoverde DP. Ciencia, responsabilidad y derecho a la salud en el diagnóstico de la COVID-19. Edu Méd Sup. 2020; 34 (4): e-2525.

Paulo Murillo Neufeld, PhD

Editor-Chefe da Revista Brasileira de Análises Clínicas

Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil

Main SARS-CoV-2 variants notified in Brazil

Cleonice Maria Michelon¹

Resumo

O surgimento de variantes do SARS-CoV-2 (Coronavírus-2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave) em diversos países gera preocupação para as autoridades de saúde do mundo. As variantes do SARS-CoV-2 apresentam mutações, principalmente na proteína S, que estão relacionadas a maior transmissibilidade, tornando-se dominantes em determinadas regiões em curto espaço de tempo. Essas mutações parecem estar associadas também a maior virulência, resistência aos anticorpos tanto monoclonais quanto produzidos em resposta a infecção prévia ou vacina, além da maior frequência de reinfecções. Nesta revisão, foram descritas as variantes Alfa, Beta, Gama, Delta, Zeta e Lambda classificadas como variantes de preocupação e de interesse, segundo a Organização Mundial da Saúde. Estas variantes foram notificadas no Brasil até o momento, e a revisão aborda suas principais características e os possíveis impactos sobre a saúde humana.

Palavras-chave

SARS-CoV-2; variantes; Brasil; COVID-19

INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 (do inglês **Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2**), agente etiológico da COVID-19 (do inglês **CoronaVirus Disease 2019**), pertence à família dos Coronavírus, que são um grupo de vírus envelopados que possuem RNA linear de fita simples sentido positivo. O SARS-CoV-2 apresenta quatro proteínas estruturais principais: a glicoproteína de superfície (do inglês *spike*) (S), a proteína do envelope (E), a proteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N).⁽¹⁾

Desde o início da pandemia de COVID-19, análises genéticas do SARS-CoV-2 em vários países e em diferentes momentos revelaram que o vírus sofreu diversas mutações.⁽²⁻⁵⁾ As mutações são eventos naturais da replicação viral, sendo muito mais frequentes em vírus de genoma RNA. A maior parte das mutações é neutra, ou seja, não fornece qualquer vantagem ou desvantagem para o vírus. Entretanto, um pequeno número de mutações pode conferir novas propriedades químicas às proteínas virais, resultando em mudanças na forma como o vírus se comporta nas infecções.⁽⁶⁾

As mutações na proteína S apresentadas pelo SARS-CoV-2 são as mais relevantes do ponto de vista

clínico-epidemiológico, considerando seu importante papel no processo infeccioso.⁽⁷⁾ A proteína S é uma grande glicoproteína transmembrana presente na superfície externa dos Coronavírus. A proteína é clivada por proteólise formando as subunidades S1, responsável pela adsorção do vírus à superfície da célula, e S2, que promove a fusão do envelope do vírus com a membrana plasmática da célula.⁽⁸⁾ A infecção celular acontece pela interação do domínio RDB (do inglês *receptor-binding domain*) da subunidade S1 do vírus com o receptor da enzima conversora de angiotensina-2 (ECA-2) da célula alvo.^(7,8)

Mutações na proteína S que aumentam a afinidade do vírus pelo receptor celular ou a quantidade de vírus eliminada durante o curso da infecção podem estar associadas ao aumento da transmissão do vírus.^(7,9-11) Exemplos são as mutações D614G, associadas a elevada carga viral e maior transmissibilidade,⁽¹¹⁾ e 501Y, também associada a maior transmissibilidade.^(8,10,12)

O acesso público global aos bancos de dados e plataformas genômicas, como *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID), *GenBank*, *Genome Warehouse* (NGDC) e *National Microbiology Data Center* (NMDC), permitiu o rastreamento em tempo real da emergência e disseminação das mutações identificadas no SARS-CoV-2

¹ Doutora, Departamento de Análises Clínicas – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100961

nas diferentes partes do mundo. Nesse contexto, a presente revisão teve como objetivo descrever as principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil. Para tanto, foi realizada uma busca na literatura sobre a identificação de variantes de preocupação e de interesse em nosso país, com foco em suas principais características e seus possíveis impactos sobre a saúde humana.

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DO SARS-COV-2

O sequenciamento genômico do SARS-CoV-2 e a divulgação oportuna dos dados levaram à caracterização do agente etiológico envolvido no surto inicial, bem como ao desenvolvimento de protocolos diagnósticos e ao acompanhamento da evolução da pandemia de COVID-19. O sequenciamento genômico tornou-se uma ferramenta essencial para gerar dados virológicos de SARS-CoV-2, permitindo a detecção das diversas mutações.⁽¹³⁾

Apesar das denominações clado, linhagem e variante não corresponderem a uma hierarquia taxonômica oficial, desde sua caracterização genômica, o SARS-CoV-2 foi classificado em diferentes grupos genéticos ou clados e subdividido em categorias de acordo com o sistema de nomenclatura utilizado. Mutações específicas definem os grupos genéticos virais (também denominados linhagens), enquanto o surgimento de mutações adicionais, promovendo diferenças dentro de cada grupo genético, dá origem às denominadas variantes.⁽¹⁴⁾ Para facilitar a compreensão e o acompanhamento das evoluções genéticas do SARS-CoV-2 e reduzir estigmas geográficos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou um novo sistema de nomenclatura unificado, que usa o alfabeto grego, para classificar as variações do vírus.⁽¹⁵⁾

A partir da identificação do SARS-CoV-2 até março de 2021, mais de 845 mil sequências genômicas completas foram compartilhadas através de bases de dados de acesso público.⁽¹⁶⁾ Com base nesses dados foram identificadas diversificações genéticas agrupadas em três diferentes clados. Dentro de cada clado, diferentes linhagens e variantes foram observadas, destacando uma crescente modificação do vírus SARS-CoV-2 ao longo do tempo. A cocirculação de diferentes clados genéticos foi observada em vários países, bem como a migração de linhagens genéticas da Europa para a América do Sul.⁽¹⁷⁾ Entretanto, é importante salientar que as informações sobre os clados predominantes em nível global devem ser interpretadas com cautela, devido a representação enviesada dos dados, com maior participação de países de alta renda.⁽¹⁸⁾

O grupo de trabalho da OMS que acompanha a evolução do SARS-CoV-2, avaliando diversos fatores incluindo transmissibilidade, virulência, alterações fenotípicas e propagação, classificou as variantes circulantes globalmente em variantes de preocupação (VOC, do inglês, *variant of*

concern) e variantes de interesse em saúde pública (VOI, do inglês *variant of interest*). Foram classificadas no grupo das VOC as variantes Alfa (B.1.1.7), identificada inicialmente no Reino Unido, Beta (B.1.351), descoberta na África do Sul, Gama (B.1.1.28.1), originária do Brasil (Manaus) e Delta (B.1.617.2), identificada na Índia. No grupo das VOI as variantes Eta (B.1.525), detectada em diversos países, Epsilon (B.1.427/B.1.429), identificada nos Estados Unidos da América (Califórnia), Zeta (B.1.1.28.2), originária do Brasil (Rio de Janeiro), Teta (B.1.1.28.3), detectada nas Filipinas e no Japão, Iota (B.1.526), descoberta nos Estados Unidos da América, Kapa (B.1.617.1) detectada na Índia, e Lambda (C.37), originária do Peru⁽¹⁸⁾ (Quadro 1).

LINHAGENS E VARIANTES CIRCULANTES NO BRASIL

No Brasil, no período de janeiro de 2020 a maio de 2021 foram registradas mudanças na frequência das linhagens dominantes, segundo dados da Rede Genômica Fiocruz (Figura 1). Inicialmente a epidemia foi impulsionada principalmente pelas linhagens B.1.1.28 e B.1.1.33, que foram as mais prevalentes até outubro de 2020.⁽¹⁹⁾ Após esse período, destaca-se a circulação de duas variantes de origem nacional, P.1 e P.2, originadas da linhagem B.1.1.28.⁽¹⁶⁾ As duas variantes brasileiras juntas, em apenas quatro meses após sua emergência, corresponderam a 75% dos sequenciamentos no território nacional.⁽⁷⁾ No que tange a notificação das variantes de preocupação e de interesse em saúde pública, foram registradas no Brasil, até julho de 2021, as quatro variantes classificadas como VOC e duas (Zeta e Lambda) das sete variantes classificadas como VOI pela OMS.

VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO E DE INTERESSE REGISTRADAS NO BRASIL

ALFA (Variante B.1.1.7 - Variante do Reino Unido)

A variante Alfa (também denominada B.1.1.7, 20B/501Y.V1 ou VOC-202012/01) foi detectada em setembro de 2020, tornando-se a linhagem dominante no Reino Unido em dezembro de 2020, mesmo mês em que foi identificada no Brasil. Essa variante apresenta sete mutações na proteína S, incluindo a mutação N501Y que está associada a maior afinidade do vírus pelo receptor ECA-2,^(8,10,12) o que pode explicar a sua rápida expansão,^(10,12) bem como a maior resistência à neutralização por anticorpos.⁽²⁰⁾ A mutação N501Y caracteriza-se pela substituição do aminoácido asparagina pela tirosina na posição 501, no domínio de ligação ao receptor (RDB) da proteína S.⁽¹⁰⁾ Essa mutação aumentou em sete vezes a afinidade do vírus pelo receptor ECA-2.⁽⁸⁾ Um estudo realizado por Supasa e colaboradores que testou a capacidade neutralizante do soro obtido de pacientes

Quadro 1 - Variantes de interesse e variantes de preocupação do SARS-CoV-2.

OMS	Nextrain clado	Pango linhagem	GISAID clado	Primeira detecção	Primeiras amostras	Mutações características
Variantes de preocupação (VOC)						
Alfa	20J/501Y.V1	B.1.1.7	GRY GR/501Y.V1	Reino Unido	Set 2020	H69/V70del, Y144del, N501Y, A570D, P681H, S106/G107/F108del
Beta	20H/501Y.V2	B.1.351	GH/501Y.V2	África do Sul	Ago 2020	L242/A243/L244del, K417N, E484K, N501Y, S106/G107/F108del
Gama	20J/501Y.V3	B.1.1.28.1 conhecida como P.1	GR/501Y.V3	Brasil e Japão	Dez 2020	K417T, E484K, N501Y, S106/G107/F108del
Delta	21A/S:478K	B.1.617.2	G/452R.V3	Índia	Out 2020	T19R, (G142D), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N
Variantes de interesse (VOI)						
Epsilon	20C/S.452R	B.1.427/ B.1.429	GH/452R.V1	Estados Unidos da América	Jun 2020	L452R, W152C, S13I, D614G
Zeta	20B/S.484K	B.1.1.28.2 conhecida como P.2	GR	Brasil	Abril 2020	L18F, T20N, P.26S, F157L, E484K, D614G, S929I, V1176F
Eta	20A/S484K	B.1.525	G/484K.V3	Múltiplos países	Dez 2020	H69-V70del, Y144del, Q52R, E484K, Q677H, D616G, S929I, V1176F
Teta	20B/S:265C	B.1.1.28.3 conhecida como P.3	GR	Filipinas e Japão	Fev 2021	141-143del, E484K, N501Y, P681H
Iota	20C/S:484K	B.1.526	GH	Estados Unidos da América	Nov 2020	LSF, T95I, D253G, D614G, V483A, H655Y, G669S, Q949R, N1187D
Kapa	21A/S:154K	B.1.617.1	G/452R.V3	Índia	Out 2020	(T95I), G142D, E154K, L452R, E484Q, D614G, P681R, Q1071H
Lambda	21G	C.37	GR/452Q.V1	Peru	Dez 2020	246-252del, G75V, T76I, L452Q, F490S, D614G e T859N

Fonte: Adaptado de COVID-19 Weekly Epidemiological Update. WHO, 13 July 2021. (<https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---13-july-2021>). Consultado em 14/07/2021.

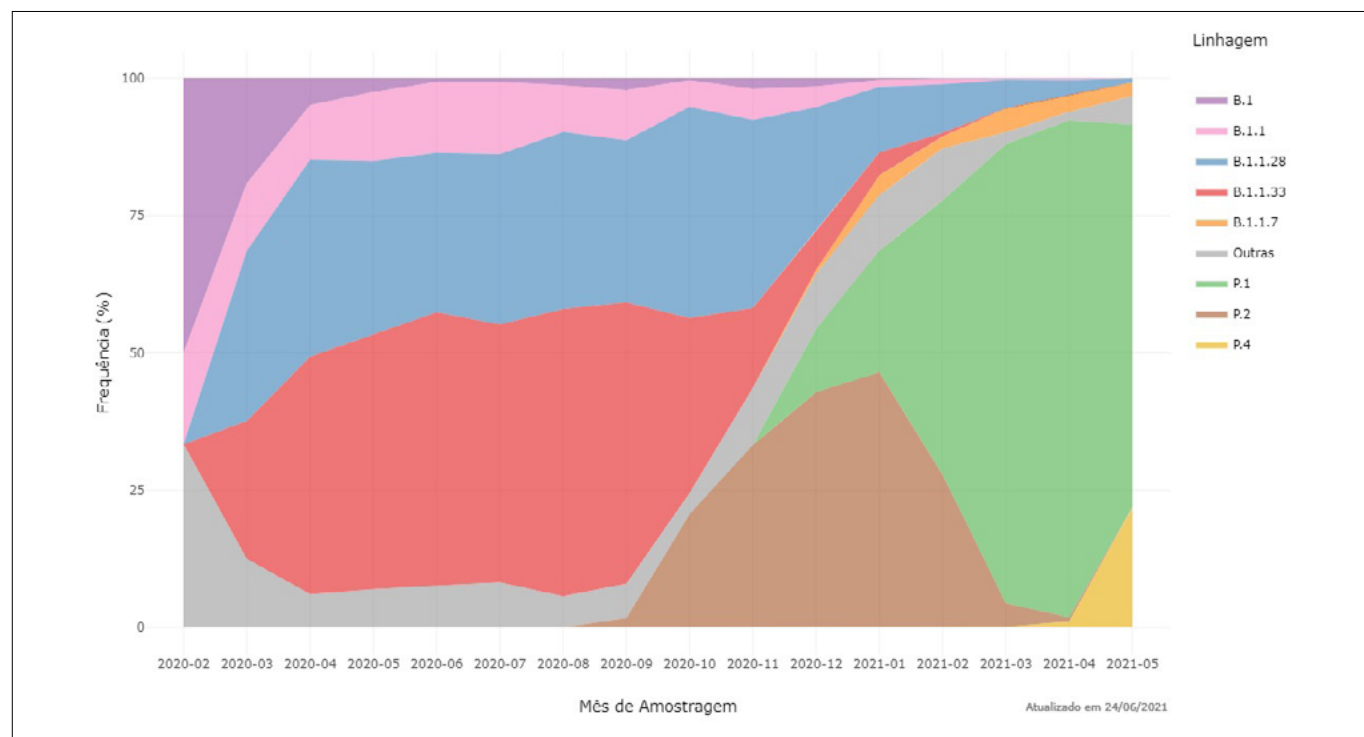


Figura 1. Frequência das principais linhagens de SARS-CoV-2 por mês de amostragem (janeiro/2020 a maio/2021) no Brasil.

Fonte: Rede Genômica – Fiocruz. (<http://www.genomahcov.fiocruz.br/frequencia-das-principais-linhagens-do-sars-cov-2-por-mes-de-amostragem/>). Consultado em 14/07/2021.

convalescentes de infecção pelo SARS-CoV-2, linhagem Wuhan, e soro de indivíduos que receberam vacina da Oxford-AstraZeneca e Pfizer contra o vírus B.1.1.7 concluiu que a variante exigia maiores concentrações de soro para atingir a neutralização. Entretanto, o escape generalizado de anticorpos monoclonais e anticorpos gerados por infecção natural ou vacinação não foi observado.⁽²⁰⁾

Além da mutação N501Y, essa variante carrega algumas deleções que resultaram na perda de aminoácidos no domínio N-terminal (NTD) da proteína S. Essas deleções também podem contribuir para o escape da resposta imune,⁽²⁰⁾ considerando que o NTD constitui um super sítio de ligação de anticorpos neutralizantes.⁽²¹⁾ A perda desses aminoácidos pode influenciar também na sensibilidade de kits diagnósticos que empregam sondas voltadas à detecção desta sequência. Devido à deleção, sondas usadas em ensaios comerciais perdem a capacidade de se ligar ao amplicon, gerando resultado falso negativo.⁽²²⁾

A variante foi considerada mais transmissível^(10,23) e mais letal^(24,25) quando comparada as cepas dominantes registradas no Reino Unido anteriormente. Um estudo de coorte encontrou risco relativo de morte de 1,64 (IC de 95% 1,32 a 2,04) entre indivíduos infectados com o vírus B.1.1.7 comparado com outras linhagens.⁽²⁴⁾ Estudos observacionais retrospectivos também estimaram um risco aumentado de morte (35%) associado à variante.⁽²⁵⁾ Não existem até o momento evidências de doença mais grave em crianças e jovens acometidos pela variante Alfa,⁽²⁶⁾ apesar dos registros de aumento na proporção de casos com necessidade de hospitalização em indivíduos com menos de 60 anos.⁽²⁷⁾

BETA (Variante B.1.351 - Variante Sul-Africana)

A variante Beta (B.1.351 ou 501Y.V2) surgiu na África do Sul, no início de outubro de 2020 e se espalhou rapidamente para regiões próximas. A variante foi identificada após a primeira onda da epidemia em uma área metropolitana gravemente afetada, Nelson Mandela Bay, localizada na costa da Província do Cabo Oriental, de onde se espalhou tornando-se dominante, em poucas semanas, nas províncias de Eastern Cape e Western Cape e na Europa Ocidental.⁽⁹⁾ Até fevereiro de 2021 a variante já era detectada em 35 países,⁽²⁸⁾ entretanto, a confirmação de registros dessa variante no Brasil ocorreu somente no final de abril do mesmo ano.⁽²⁹⁾

Comparada à cepa de referência do vírus SARS-CoV-2 (cepa de Wuhan), a variante apresenta 12 mutações não sinônimas e uma deleção. A maioria das mutações (7) e deleção (1) encontradas está localizada na proteína S, enquanto as demais estão localizadas nas regiões ORF1a, proteína E e proteína N.⁽²⁸⁾ O alto número de mutações nas regiões imunodominantes da proteína S, incluindo três (K417N, E484K e N501Y) no RBD^(9,28) e quatro na região NTD, sugere possibilidade de escape dos anticorpos neutralizantes.⁽²⁸⁾

A mutação N501Y, conforme descrito anteriormente, está relacionada a maior afinidade do vírus pelo receptor ECA-2^(8,10,12) e a maior resistência à neutralização por anticorpos.⁽²⁰⁾ As mutações E484K e K417N, presentes também no RBD da proteína S, desempenham papel fundamental na interação do vírus com o receptor e na evasão imunológica.⁽²⁸⁾ Na mutação E484K, o ácido glutâmico (aminoácido com carga elétrica negativa) é substituído por uma lisina (aminoácido carregado positivamente). Essa mudança de carga na região flexível do RBD parece criar uma interação significativamente mais forte com o receptor celular.⁽³⁰⁾ Por sua vez, a mutação K417N (substituição da lisina por asparagina) parece influenciar minimamente a interação do vírus com a célula alvo.⁽²⁸⁾ Entretanto, o conjunto das três mutações intensifica a afinidade do vírus pelo receptor, aumentando a transmissibilidade e permitindo escape da neutralização por anticorpos anti-SARS-CoV-2.⁽³⁰⁾ As demais mutações presentes na proteína S da variante se encontram na região NTD, que também é uma região alvo de anticorpos neutralizantes. Estudos destacam que a combinação de mutações nas regiões RBD e NTD da proteína S afeta significativamente a neutralização da variante Beta por anticorpos monoclonais e soros imunes obtidos de pacientes convalescentes ou vacinados.^(8,31-33)

Em relação à gravidade da doença produzida pela variante Beta, apesar de um estudo realizado na Europa ter demonstrado que os pacientes infectados com a variante tiveram maior necessidade de admissão em unidades de terapia intensiva, quando comparados aos infectados pelas outras VOC,⁽²⁷⁾ não existem, até o momento, evidências robustas que comprovem maior grau de virulência ou maior gravidade da doença relacionada a variante Beta.⁽³⁴⁾

GAMA (Variante B.1.1.28.1 ou P.1 - Variante Brasileira - Manaus)

Essa variante foi notificada à OMS em janeiro de 2021 pelo Japão, após detecção em quatro viajantes provenientes do Brasil.^(7,14) A variante Gama (também denominada linhagem P.1) identificada em dezembro de 2020 em Manaus, capital do estado do Amazonas, esteve ausente nas amostras coletadas até novembro de 2020. Entretanto, em dezembro do mesmo ano, a variante foi identificada em 42% das amostras e em 91% em janeiro de 2021 no mesmo município, sugerindo transmissão local.^(7,35) Até 20 de abril de 2021, a variante Gama já havia sido registrada em 43 países, segundo boletim epidemiológico semanal publicado pela OMS.⁽¹⁵⁾

A P.1 apresenta uma constelação única de mutações, incluindo alterações genéticas importantes do ponto de vista clínico-epidemiológico.⁽³⁵⁾ A P.1 compartilha a mutação N501Y, relacionada a maior transmissão, com as variantes Alfa e Beta, além de exibir mais duas mutações no RBD da proteína S, a mutação E484K e a mutação K417T. As

mutações citadas estão associadas à evasão da resposta imune.^(8,9,35,36) Wang e colaboradores identificaram que a linhagem P.1 é refratária a diversos anticorpos monoclonais, apresentando também maior resistência à neutralização por plasma convalescente e soros obtidos de indivíduos vacinados.⁽³⁶⁾ Segundo alguns autores, essa nova linhagem está relacionada a maior transmissibilidade e maior risco de reinfecção por Coronavírus.^(35,36)

Um estudo que comparou dados de pacientes de sete países europeus infectados por VOC e não-VOC identificou maior necessidade de internação hospitalar em pacientes com a variante P.1 (20%) quando comparados aos infectados por outras variantes.⁽²⁷⁾ Outro estudo demonstrou, ainda, que simultaneamente ao surgimento da linhagem P.1 no estado do Amazonas houve aumento na mortalidade de indivíduos com COVID-19 na faixa etária dos 20 aos 50 anos, em ambos os sexos. Esses dados sugerem que as mutações presentes na variante P.1 podem estar associadas a alterações na virulência e na patogenicidade do vírus.⁽³⁷⁾

ZETA (Variante B.1.1.28.2 ou P.2 - Variante Brasileira – Rio de Janeiro)

Essa variante, também denominada linhagem P.2, foi identificada em outubro de 2020 no estado do Rio de Janeiro. Após sua detecção, o sequenciamento de genomas coletados de vários municípios do estado, entre abril e novembro, detectou a presença da variante em amostras do mês de julho de 2020, cerca de quatro meses antes de sua identificação.⁽³⁸⁾ A proporção dessa variante aumentou significativamente entre setembro de 2020, quando correspondia a 0,7% das amostras, e fevereiro de 2021, quando foi detectada em 45% das amostras sequenciadas no país.⁽¹⁴⁾ Em apenas quatro meses a P.2 foi notificada em 16 países.⁽³⁸⁾ Nas Américas, a variante foi identificada na Argentina, no Chile, nos Estados Unidos da América, no México, na ilha de São Martinho, no Uruguai e na Venezuela.⁽¹⁶⁾

A P.2 é caracterizada por cinco mutações definidoras e outras cinco mutações presentes na maioria dos genomas.⁽³⁸⁾ A P.2 apresenta somente uma mutação na proteína S, a mutação E484K no RBD. Essa mutação está associada ao aumento da interação do vírus com o receptor ECA-2 e ao escape de anticorpos neutralizantes contra o SARS-CoV-2.^(7,38,39)

Dentre as mutações presentes no RBD, a mais preocupante parece ser a E484K. E484 é o local onde as mutações tendem a ter o maior efeito sobre a ligação de anticorpos.⁽⁴⁰⁾ Estudos mostraram que as mutações no local E484 reduzem a potência de neutralização de alguns plasmas humanos em mais de 10 vezes, embora outros plasmas não sejam afetados por mutações neste local.^(40,41) A resistência à neutralização das variantes que apresentam a mutação E484K por anticorpos pode explicar os recentes casos de reinfecção pela P.2 observados no Brasil.^(42,43)

DELTA/KAPA (Variante B.1.617 - Variante Indiana)

A variante B.1.617 foi identificada primeiramente na Índia em dezembro de 2020, embora uma versão anterior tenha sido detectada em outubro de 2020. Em abril de 2021 a variante já havia sido notificada em 21 países.⁽⁴⁴⁾ Segundo os últimos dados da OMS, a variante foi classificada em três linhagens, denominadas B.1.617.1, B.1.617.2 e B.1.617.3, com pequenas diferenças e distinta distribuição geográfica.⁽¹⁸⁾

No Brasil, os primeiros casos de COVID-19 causados pela variante indiana foram confirmados na segunda quinzena de maio de 2021. Inicialmente, um caso no estado do Maranhão, seguido por casos notificados no Rio de Janeiro, em Minas Gerais, no Paraná e em Goiás,⁽⁴⁵⁾ totalizando mais de 100 casos até meados de julho de 2021.

Na variante B.1.617 foram identificadas 13 mutações que resultaram em substituições de aminoácidos.⁽⁴⁴⁾ As mutações que mais preocupam são as encontradas na proteína S, incluindo duas mutações na região NTD (G142D e E154K), duas na região RBD (L452R e E484Q) e uma no local de clivagem da furina polibásica no limite S1/S2 (P681R).⁽⁴⁶⁾

As mutações na região RBD combinadas com a mutação no local de clivagem da furina podem resultar em aumento na ligação do vírus à ECA-2 e maior taxa de clivagem S1/S2, resultando em maior transmissibilidade.⁽⁴⁴⁾ Além disso, um estudo demonstrou que apesar da maioria dos soros de indivíduos convalescentes e vacinados com Pfizer e Moderna ter capacidade de neutralizar a variante B.1.617, esta se mostrou seis a oito vezes mais resistente à neutralização quando comparada à cepa WA1/2020, cepa de referência para estudo do SARS-CoV-2 nos Estados Unidos da América.⁽⁴⁶⁾ Outro estudo demonstrou que soros de indivíduos convalescentes e soros de indivíduos imunizados com as vacinas Pfizer-BioNTech e Oxford-AstraZeneca mostraram neutralização reduzida das variantes B.1.617.2 (Delta) e B.1.617.1 (Kapa). O mesmo estudo sugeriu ainda que indivíduos infectados anteriormente com as variantes B.1.351 (Beta) e P.1 (Gama) são provavelmente mais suscetíveis à reinfecção pela cepa Delta.⁽⁴⁷⁾

LAMBDA (Variante C.37 – Variante Andina)

A variante Lambda foi relatada pela primeira vez em Lima, capital do Peru, em dezembro de 2020, quando correspondia a 0,5% dos genomas avaliados, expandindo para 96,6% em abril de 2021.⁽⁴⁸⁾ Em meados de junho de 2021, já era encontrada em 26 países nas Américas, na Europa e na Oceania. Esta variante, que tem elevada prevalência em alguns países da América do Sul, foi identificada no Brasil em fevereiro de 2021, no estado de São Paulo, e desde então tem sido apenas ocasionalmente notificada.⁽⁴⁹⁾

A variante Lambda apresenta a deleção 3575-3677 no gene ORF1a, também presente nas variantes Alfa, Beta e Gama. Além disso, a variante apresenta uma deleção

(246-252) e múltiplas mutações não sinônimas (G75V, T76I, L452Q, F490S, D614G e T859N) no gene da proteína S. As mutações L452Q e F490S estão na região RBD da proteína S.⁽⁴⁹⁾

A mutação L452Q é similar à L452R, presente nas variantes Delta, Epsilon e Kapa, associada ao escape da neutralização por anticorpos e maior infectividade devido ao aumento da afinidade para o receptor ECA-2. A mutação F490S também foi associada ao escape da neutralização por anticorpos.⁽⁴⁸⁾ Um estudo *in vitro* realizado no Chile demonstrou neutralização por anticorpos 3,05 vezes menor para a variante Lambda quando comparada à linhagem selvagem. O estudo utilizou plasma de doadores que receberam duas doses da vacina Coronavac. O mesmo estudo demonstrou, ainda, aumento na infectiosidade da variante Lambda, quando comparada às variantes Alfa e Gama.⁽⁵⁰⁾

OUTRAS VARIANTES RECENTEMENTE IDENTIFICADAS NO BRASIL

Variantes da linhagem B.1.1.33

A linhagem B.1.1.33 foi uma das principais e mais difundidas no Brasil no ano de 2020. Diversas variantes dessa linhagem já foram definidas, entretanto nenhuma delas apresentava mutação preocupante na proteína S.⁽⁵¹⁾ Recentemente foram identificadas no Brasil duas novas variantes, cujas inferências evolutivas apontam para a ancestral B.1.1.33: a N9, que apresenta a ocorrência da mutação E484K,^(51,52) e a N10, que apresenta 14 mutações definidoras de linhagem, incluindo mutações no RBD (E484K e V445A) e três deleções no NTD da proteína S.⁽⁵³⁾

Variantes da linhagem B.1.1.28

Além das variantes P.1 e P.2, estudos apontam duas possíveis novas variantes, uma denominada NP.13L e a outra denominada P.4, que também descendem da linhagem B.1.1.28, uma das linhagens predominantes no Brasil. Descrita pela primeira vez em janeiro de 2021, no sul do Brasil, a variante NP.13L foi detectada também na Paraíba e na Bahia, além da Inglaterra, do Japão e da Holanda.⁽⁵²⁾ A NP.13L é caracterizada por 12 mutações definidoras de linhagem, incluindo a mutação E484K na proteína S.⁽⁵⁴⁾ Já a variante P.4 foi identificada em maio de 2021 no interior do estado de São Paulo. Essa variante, reconhecida pela Sociedade Brasileira de Virologia, apresenta a mutação L452R na proteína S, mutação também presente na variante indiana.⁽⁵⁵⁾

CONCLUSÃO

Desde o surgimento dos primeiros casos de infecção pelo SARS-CoV-2 até o presente momento, estamos sendo constantemente confrontados com o surgimento de novas variantes ao redor do mundo. No Brasil, foram notificados

casos de COVID-19 por diversas linhagens, incluindo as quatro variantes de preocupação e duas variantes de interesse, segundo classificação da OMS. Importante destacar que, destas, duas são de origem nacional (P.1 e P.2) e novas variantes estão sendo caracterizadas.

As principais características das novas variantes consistem em maior afinidade de ligação ao receptor celular, característica que está relacionada a maior transmissão, presente em todas as variantes de preocupação; resistência aumentada a anticorpos neutralizantes, característica mais significativa nas variantes Beta (B.1.351), Gama (P.1) e Delta (B.1.617.2); aumento da virulência, observado principalmente na variante Alfa (B.1.1.7); risco aumentado de reinfeção, principalmente para as variantes Gama (P.1) Zeta (P.2) e Delta (B.1.617.2).

Nesse contexto, a manutenção de medidas preventivas como o uso de máscaras, distanciamento social e ampliação da vacinação, para minimizar a circulação do vírus, prevenindo infecções e consequentemente reduzindo as possibilidades de evolução do SARS-CoV-2, é imperativa para o controle da pandemia. O monitoramento genético constante das cepas de SARS-CoV-2 também se faz necessário, pois além de permitir a rápida identificação do surgimento de novas variantes, contribui para o entendimento da dinâmica da pandemia e para a produção de novas vacinas e testes diagnósticos.

Abstract

The emergence of SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) variants in a lot of countries raises concern for health authorities around the world. The SARS-CoV-2 variants present mutations, mainly in the S protein, which are related to increase transmissibility, becoming dominant in certain regions in a short time. These mutations also seem to be associated with higher virulence, resistance to both monoclonal antibodies and those produced in response to previous infection or vaccine and to the most frequency of re-infections. In this review, the Alpha, Beta, Gamma, Delta, Zeta and Lambda variants classified as concern and interest variants, according to the World Health Organization, was described. These variants have been reported in Brazil until now, and the review addresses their main characteristics and possible impacts on human health.

Keywords

SARS-CoV-2; variants; Brazil; COVID-19

REFERÊNCIAS

1. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2020 Sep 24;39(9):1629–35. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10096-020-03899-4>
2. Forster P, Forster L, Renfrew C, Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2020 Apr 28;117(17):9241–3. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.2004999117>
3. Islam MR, Hoque MN, Rahman MS, Alam ASMRU, Akther M, Puspo JA, et al. Genome-wide analysis of SARS-CoV-2 virus strains circulating worldwide implicates heterogeneity. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 19;10(1):14004. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-020-70812-6>

4. Toyoshima Y, Nemoto K, Matsumoto S, Nakamura Y, Kiyotani K. SARS-CoV-2 genomic variations associated with mortality rate of COVID-19. *J Hum Genet* [Internet]. 2020 Dec 22;65(12):1075–82. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s10038-020-0808-9>
5. van Dorp L, Acman M, Richard D, Shaw LP, Ford CE, Ormond L, et al. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2020 Sep;83:104351. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134820301829>
6. Grubaugh ND, Petrone ME, Holmes EC. We shouldn't worry when a virus mutates during disease outbreaks. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020 Apr 18;5(4):529–30. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41564-020-0690-4>
7. Freitas RRA, Giovanetti M, Alcantara LCJ. Variantes emergentes do SARS-CoV-2 e suas implicações na saúde coletiva. *Interam J Med Heal* [Internet]. 2021; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33890566>
8. Dejnirattisai W, Zhou D, Supasa P, Liu C, Mentzer AJ, Ginn HM, et al. Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2. *Cell* [Internet]. 2021 Mar; Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421004281>
9. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. 2020;2. Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.12.21.20248640v1.full.pdf>
10. Leung K, Shum MH, Leung GM, Lam TT, Wu JT. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro Surveill* [Internet]. 2021;26(1). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33413740>
11. Volz E, Hill V, McCrone JT, Price A, Jorgensen D, O'Toole Á, et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell* [Internet]. 2021;184(1):64–75. e11. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33275900>
12. Santos J, Passos G. The high infectivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 is associated with increased interaction force between Spike-ACE2 caused by the viral N501Y mutation. *bioRxiv Prepr* [Internet]. 2021;501:1–9. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.12.29.424708v1>
13. World Health Organization - WHO, editor. Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. Geneva; 2021. 94 p.
14. Update E. Atualização epidemiológica: Variantes de SARS-CoV-2 nas Américas [Internet]. Brasília-DF: Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS; 2021. p. 1–10. Disponível em: <https://www.paho.org/>
15. WHO. COVID-19 Weekly Epidemiological Update 42 [Internet]. World Health Organization. 2021. p. 1–28. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/weekly-epidemiological-update_22.pdf
16. Update E. Atualização epidemiológica: Variantes do SARS-CoV-2 nas Américas [Internet]. Brasília-DF: Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS; 2021. p. 1–9. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53376>
17. Castells M, Lopez-Tort F, Colina R, Cristina J. Evidence of increasing diversification of emerging Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 strains. *J Med Virol*. 2020;92(10):2165–72. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.26018>
18. WHO. COVID-19 Weekly Epidemiological Update 48 [Internet]. World Health Organization. 2021. p. 1–16. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---13-july-2021>
19. Candido DS, Claro IM, de Jesus JG, Souza WM, Moreira FRR, Dellicour S, et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science* (80-) [Internet]. 2020 Sep 4;369(6508):1255–60. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abd2161>
20. Supasa P, Zhou D, Dejnirattisai W, Liu C, Mentzer AJ, Ginn HM, et al. Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant by convalescent and vaccine sera. *Cell*. 2021;184(8):2201–2211.e7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7891044/>
21. Cerutti G, Guo Y, Zhou T, Gorman J, Lee M, Rapp M, et al. Potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies directed against spike N-terminal domain target a single supersite. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2021 Mar; Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312821001335>
22. Bal A, Destras G, Gaymard A, Stefic K, Marlet J, Eymieux S, et al. Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69-V70, France, August to December 2020. *Euro Surveill* [Internet]. 2021;26(3). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33478625>
23. Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, Kucharski AJ, Munday JD, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Apr 9;372(6538):eabg3055. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.abg3055>
24. Challen R, Brooks-Pollock E, Read JM, Dyson L, Tsaneva-Atanasova K, Danon L. Risk of mortality in patients infected with SARS-CoV-2 variant of concern 202012/1: matched cohort study. *BMJ* [Internet]. 2021;372:n579. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33687922>
25. Davies NG, Jarvis CI, Edmunds WJ, Jewell NP, Diaz-Ordaz K, Keogh RH. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nature* [Internet]. 2021 Mar 15; Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41586-021-03426-1>
26. Brookman S, Cook J, Zucherman M, Broughton S, Harman K, Gupta A. Effect of the new SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 on children and young people. *Lancet Child Adolesc Heal* [Internet]. 2021;5(4):e9–10. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S2352-4642\(21\)00030-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2352-4642(21)00030-4)
27. Funk T, Pharris A, Spiteri G, Bundle N, Melidou A, Carr M, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 variants of concern B.1.1.7, B.1.351 or P.1: data from seven EU/EEA countries, weeks 38/2020 to 10/2021. *Euro Surveill* [Internet]. 2021;26(16):1–10. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33890566>
28. Gómez CE, Perdiguerro B, Esteban M. Emerging sars-cov-2 variants and impact in global vaccination programs against sars-cov-2/ covid-19. *Vaccines*. 2021;9(3):1–13.
29. Slavov SN, Patané JSL, Bezerra R dos S, Giovanetti M, Fonseca V, Martins AJ, et al. Genomic monitoring unveil the early detection of the SARS-CoV-2 B.1.351 lineage (20H/501Y.V2) in Brazil. *medRxiv* [Internet]. 2021;1–17. Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.03.30.21254591v1>
30. Nelson G, Buzko O, Spilman P, Niazi K, Rabizadeh S, Soon-Shiong P. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the 2 combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant. *bioRxiv* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.01.13.426558v1.full.pdf>
31. Wang P, Casner RG, Nair MS, Wang M, Yu J, Liu L, et al. Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2021 May 12;29(5):747–751.e4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8053237/pdf/main.pdf>
32. Cele S, Gazy I, Jackson L, Hwa SH, Tegally H, Lustig G, et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma. *Nature*. 2021 Mar 593(7857):142–146; Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03471-w>
33. Zhou D, Dejnirattisai W, Supasa P, Liu C, Mentzer AJ, Ginn HM, et al. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell* [Internet]. 2021 Apr;184(9):2348–2361.e6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421002269>

34. Science Brief: Emerging SARS-CoV-2 Variants [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention - CDC; 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-emerging-variants.html>
35. Faria N, Claro IM, Candido D, Franco LAM, Andrade PS, Coletti TM, et al. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. *Virological Prepr* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://virological.org>
36. Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Barnes CO, Fink S, et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature* [Internet]. 2021;592(April). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03324-6>
37. Freitas ARR, Beckedorff OA, Cavalcanti LP, Siqueira AM, Castro DB de, Costa CF da. The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P.1 in Amazonas (Brazil) was temporally associated with a change in the age and gender profile of COVID-19 mortality. *SciELO Prepr* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/2030>
38. Voloch CM, da Silva Francisco R, de Almeida LGP, Cardoso CC, Brustolini OJ, Gerber AL, et al. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil. *J Virol* [Internet]. 2021 Mar 1; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33649194>
39. Baum A, Fulton BO, Wloga E, Copin R, Pascal KE, Russo V, et al. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies. *Science*. 2020 Jun; 369(6506):1014-8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7299283>
40. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, Starr TN, Malone KD, Chu HY, et al. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2021;29(3):463-476.e6. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.02.003>
41. 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]. 2020 Jan 1;9(1):1254-8. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1772677>
42. Nonaka CK V., Franco MM, Gräf T, de Lorenzo Barcia CA, de Ávila Mendonça RN, de Sousa KAF, et al. Genomic Evidence of SARS-CoV-2 Reinfection Involving E484K Spike Mutation, Brazil. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2021 May;27(5):1522-4. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/5/21-0191_article.htm
43. Fintelman-Rodrigues N, Silva AP da, Santos MC dos, Saraiva FB, Ferreira MA, Gesto J, et al. Genetic Evidence and Host Immune Response in Persons Reinfected with. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2021;27(5):1-12. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/5/20-4912_article
44. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, Yadav P, Gupta N, Das M, et al. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *bioRxiv* [Internet]. 2021;2021.04.22.440932. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2021.04.22.440932>
45. Menezes M. Portal Fiocruz [Internet]. 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/pesquisa-sugere-maior-risco-de-reinfeccao-pela-variante-delta>
46. Edara V-V, Lai L, Sahoo MK, Floyd K, Sibai M, et al. Infection and vaccine-induced neutralizing antibody responses to the SARS-CoV-2 B.1.617.1 variant. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Aug; 385:664-666. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2107799>
47. Liu C, Ginn HM, Dejnirattisai W, Ren J, Stuart DI, Srean GR. Article Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B . 1 . 617 by vaccine and convalescent serum Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B . 1 . 617 by vaccine and convalescent serum. *Cell*. 2021;184:1-17.
48. Romero EP, Dávila-Barclay A, Salvatierra G, Gonzáles L, Cuicapuza D, et al. The Emergence of SARS-CoV-2 Variant Lambda (C.37) in South America. *medRxiv* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.06.26.21259487v1>
49. Wink LP, Volpato FCZ, Monteiro FL, Willig JB, Zavascki AP, et al. First identification of SARS-CoV-2 Lambda (C.37) variant in Southern Brazil. *medRxiv* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.06.21.21259241v1>
50. Acevedo ML, Palomares LA-, Bustamante A, Gaggero A, Paredes F, et al. Infectivity and immune escape of the new SARS-CoV-2 variant of interest Lambda. *medRxiv* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.06.28.21259673v1>
51. Resende PC, Gräf T, Paixão ACD, Appolinario L, Lopes RS, Mendonça AC da F, et al. A Potential SARS-CoV-2 Variant of Interest (VOI) Harboring Mutation E484K in the Spike Protein Was Identified within Lineage B.1.1.33 Circulating in Brazil. *Viruses* [Internet]. 2021 Apr 21;13(5):724. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/5/724>
52. Lamarca AP, Almeida LGP, Francisco Jr R da S, Lima LFA, Scortecchi KC, Perez VP, et al. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 tracks early interstate transmission of P.1 lineage and diversification within P.2 clade in Brazil. *medRxiv* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.03.21.21253418v2.full>
53. Resende PC, Gräf T, Neto LGL, Silva FV da, Paixão ACD, Appolinario L, et al. Identification of a new B.1.1.33 SARS-CoV-2 Variant of Interest (VOI) circulating in Brazil with mutation E484K and multiple deletions in the amino (N)-terminal domain of the Spike protein. *Virological* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://virological.org/t/identification-of-a-new-b-1-1-33-sars-cov-2-variant-of-interest-voi-circulating-in-brazil-with-mutation-e484k-and-multiple-deletions-in-the-amino-n-terminal-domain-of-the-spike-protein/675>
54. Francisco Jr R da S, Benites LF, Lamarca AP, de Almeida LGP, Hansen AW, Gularte JS, et al. Pervasive transmission of E484K and emergence of VUI-NP13L with evidence of SARS-CoV-2 co-infection events by two different lineages in Rio Grande do Sul, Brazil. *Virus Res* [Internet]. 2021 Apr;296:198345. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170221000526>
55. P4 a mais nova variante identificada no Brasil [Internet]. Sociedade Brasileira de Virologia. 2021. Disponível em: <https://sbv.org.br/sbv/p-4-a-mais-nova-variante-identificada-no-brasil/>

Correspondência

Cleonice Maria Michelin

Departamento de Análises Clínicas – ACL,

Centro de Ciências da Saúde – CCS,

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC,

Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima,

Trindade – Florianópolis – CEP 88 040-900

Tel: (48) 3721-4159 – E-mail: c.michelon@ufsc.br

Micosis en tiempos de COVID-19

Mycosis in times of COVID-19

Luis Zaror¹

Alexandra Aravena¹

Alejandra Valenzuela¹

Resumen

El brote mundial del SARS-CoV-2, descrito a partir del 2019, provocó la pandemia de COVID-19, originando un riesgo para la salud de las personas, una amenaza a la vida y una emergencia de salud pública internacional, que hasta Julio del 2021 no se ha logrado controlar. La coinfección en estos pacientes, por virus, bacterias y hongos, aumenta la dificultad de diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Es importante profundizar los conocimientos sobre el virus SARS-CoV-2 y las coinfecciones que podrían presentarse, en particular, en pacientes con COVID-19 que presentan micosis. El objetivo de esta revisión bibliográfica es, determinar la importancia de las micosis, como enfermedad oportunista, en pacientes con COVID-19. Se realizó una revisión bibliográfica sistemática, en la base de datos "PubMed-NCBI". Se utilizaron las palabras claves: "COVID-19", "SARS-CoV-2", "Coronavirus", "COVID-19 and coinfection", "Mycosis", "Aspergillus spp.", "Candida spp.", "COVID-19 and Aspergillus spp.", "COVID-19 and Candida spp.". Del análisis de la bibliografía, se concluye la importancia de las micosis respiratorias, originadas por diversos hongos en pacientes con COVID-19. Hay poca información del manejo de estas, siendo necesario fortalecer la investigación de la coinfección, para así, mejorar los flujogramas de sospecha clínica, contribuyendo a diagnósticos, tratamientos precisos y fomentar la prevención frente a esta pandemia.

Palabras claves

SARS-CoV-2; Inmunodepresión; Coinfección; *Aspergillus* spp.; *Candida* spp.

INTRODUCCIÓN

En diciembre del 2019, un nuevo Coronavirus, denominado SARS-CoV-2 productor de la enfermedad COVID-19, se propagó en la ciudad de Wuhan, China, provocando una pandemia.⁽¹⁾ Este, forma parte de la familia de virus que producen el síndrome de distrés respiratorio agudo (SARS-CoV) y el Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV).⁽²⁾ Tiene 100-160 nanómetros de diámetro y está envuelto en una bicapa lipídica. Presenta ARN de cadena positiva (Figura 1).⁽³⁾ Los coronavirus, se dividen en cuatro géneros: α , β , γ y δ , siendo seis especies las que causan enfermedades en humanos; del género α : 229E y NL63 y del género β : OC43, HKU1, SARS-CoV y MERS-CoV.⁽⁴⁾ El SARS-CoV-2 pertenece a la familia de los β - Coronavirus.⁽²⁾

En los pacientes infectados por SARS-CoV-2 encontramos diversos causantes de coinfecciones como virus, bacterias y hongos.⁽⁵⁾ Dentro de las coinfecciones están las micosis, las cuales podrían ser graves y una de las causas directas de muerte en pacientes COVID-19. Los principales hongos que afectan a estos pacientes son especies de *Aspergillus* y *Candida*.⁽⁶⁾ Las micosis aumentan la dificultad de diagnóstico, tratamiento y pronóstico, e incluso intensificarán los síntomas y mortalidad por la enfermedad.⁽⁵⁾ Por ello, los médicos y microbiólogos deben centrarse en las coinfecciones, en los pacientes, con comorbilidades, inmunodeprimidos, especialmente en la fase intermedia y tardía, realizando vigilancia de patógenos fúngicos.⁽⁶⁾

Debido a las condiciones sanitarias actuales, es importante profundizar sobre las coinfecciones que podrían presentar, los pacientes con COVID-19 que desarrollan

¹ Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Temuco, Chile.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100965

micosis, que es el objetivo de esta revisión bibliográfica sistemática.

METODOLOGÍA

Se realizó, una revisión bibliográfica sistemática, en la base de datos "PubMed-NCBI". Inicialmente, se utilizaron palabras claves: "COVID-19", "SARS-CoV-2", "Coronavirus". Para la segunda búsqueda, se filtró la información con los siguientes encabezamientos: "COVID-19 and coinfection", "Mycosis", "Aspergillus spp.", "Candida spp." "COVID-19 and Aspergillus spp.", "COVID-19 and Candida spp.". En ambas búsquedas se utilizó como criterio temporal los años 2019 al 2021. Se limitó la búsqueda en relación con SARS-CoV-2, COVID-19 y micosis, seleccionando para esta revisión bibliográfica 75 artículos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El brote mundial del virus SARS-CoV-2, descrito a partir del 2019, y que provocó la pandemia de COVID-19, ha originado un riesgo para la salud de las personas. La enfermedad presenta formas clínicas asintomáticas y sintomáticas, pudiendo generar un cuadro infeccioso potencialmente mortal, con distintos niveles de gravedad. Según la OMS, el virus se transmite principalmente a través de gotitas de saliva o secreciones nasales, predominantemente por la nariz, la boca o contacto con los ojos.⁽⁷⁾ Además, se deben considerar las graves secuelas que deja en los sobrevivientes. Esto representa una amenaza a la vida y una crisis de salud pública internacional, debido a la propagación del virus por infectados, considerando la poca preparación planetaria ante esta emergencia.⁽⁸⁾

Este nuevo virus, presenta un genoma casi idéntico al coronavirus del murciélago de herradura, *Rhinolophus affinis*, del sur de China.⁽²⁾ Se sospecha que el murciélago es el hospedador natural del virus y se puede transmitir desde éste, a través, de hospedadores intermedios desconocidos para infectar a humanos.⁽⁹⁾ Se ha especulado que existen varios reservorios, no confirmados.⁽¹⁰⁾ El hecho de que SARS-CoV-2 haya llegado a los humanos, implica la probabilidad de futuros brotes zoonóticos con virus similares.⁽¹¹⁾ La secuencia del genoma de este virus es 96,2% idéntica al CoV RaTG13 del murciélago, y comparte un 79,5% de identidad con el SARS-CoV.⁽⁴⁾

La proteína S, Spike, permite la entrada y la infección en el huésped ya que, contiene el dominio de unión al receptor de las células que infecta, y es la determinante del tropismo del virus. Consta de dos dominios: el dominio S1, encargado de la unión al receptor y el dominio S2, responsable de la fusión con la membrana celular (Figura 1).^(3,11)

Dentro de la célula, el genoma del SARS-CoV-2 codifica una poliproteína (ORF1ab), involucrada en la transcripción y replicación del ARN viral,⁽⁴⁾ usando la angiotensina II humana (ACE2) como receptor de entrada celular (Figura 2).⁽¹²⁾ La ACE2 se distribuye en las células epiteliales de los alvéolos, tráquea, bronquios, glándulas bronquiales serosas, monocitos alveolares y macrófagos del tracto respiratorio. Además, se expresa en menor frecuencia en células cardíacas, renales e intestinales.⁽¹³⁾ La ACE2 también podría expresarse en las glándulas salivales y lengua, sugiriendo que la cavidad oral sería un reservorio del SARS-CoV-2, y por ello, la importancia de la saliva como biofluido transmisor del virus y su uso como muestra para su detección.⁽⁷⁾

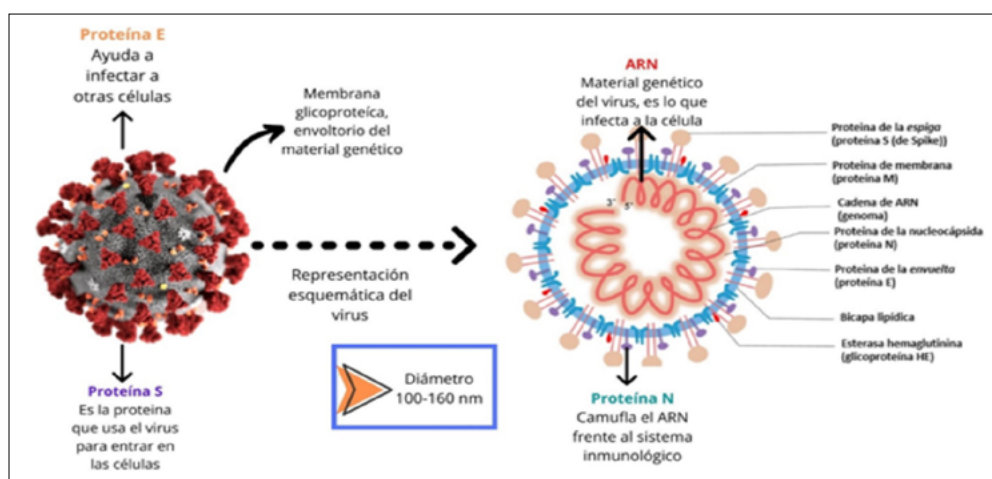


Figura 1. Estructura del virus SARS-CoV-2.

Representación esquemática del virus SARS-CoV-2. Se ve el genoma, que contiene siete marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para proteínas virales no estructurales 1a y 1b, y proteínas estructurales (S, espícula; E, envoltura; M, membrana; N, nucleocápside y ORF3, proteína accesoria). La glicoproteína S está presente en la superficie del virión en forma de picos o espigas, por la cual presenta una forma de corona cuando se observa al microscopio electrónico, la glicoproteína S es el mediador de la unión y entrada a la célula huésped, utilizando receptores presentes en las células del hospedero. Hernández SF, et al, 2020.⁽⁹⁾

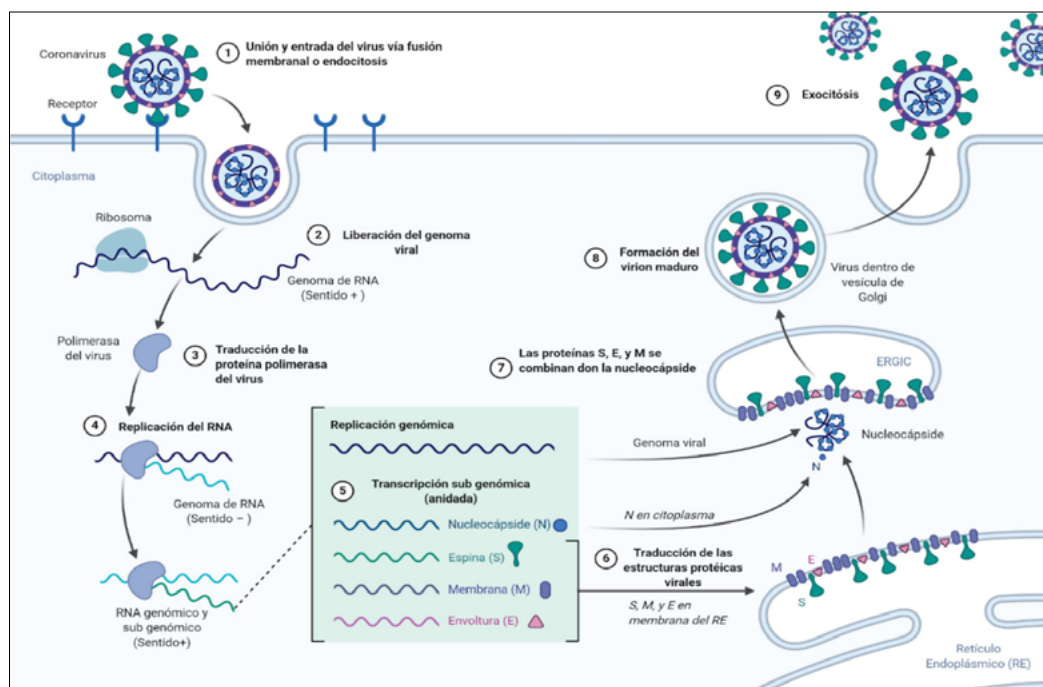


Figura 2. Patogénesis del virus SARS-CoV-2.

Esquema simplificado de replicación del SARS-CoV-2. Traducción en el ribosoma de una proteína esencial, que es la replicasa (RNA polimerasa dependiente de RNA), formación del complejo de transcripción, fabricación del mRNA con las instrucciones para sintetizar las proteínas virales en los ribosomas de la célula, y fase final de ensamblaje, maduración y exocitosis. Apaza A, et al, 2020.⁽²⁸⁾

La respuesta del sistema inmunológico se manifiesta con la inflamación y el reclutamiento de células presentadoras de antígenos; participando en esto, las células inmunitarias innatas, que son la primera línea de defensa, liberando citocinas y quimiocinas inflamatorias. Las células dendríticas son importantes para iniciar la respuesta inmune adaptativa, principalmente los linfocitos T helper (CD4+). La fuerte activación del sistema inmunológico induce una producción anormal de citocinas, conocida como “tormenta de citocinas”, especialmente en casos severos, afectando mayoritariamente a personas de mediana edad (50-69 años) y adultos mayores (≥ 70 años).^(14,15) Una de las posibles razones de esto es, el envejecimiento pulmonar que está asociado con la incapacidad de las células para multiplicarse a una velocidad normal, lo que resulta en cambios estructurales y funcionales en el tracto respiratorio, dando lugar a una función disminuida de este órgano, remodelación de células alteradas, regeneración deficiente y mayor susceptibilidad a la enfermedad.⁽¹⁶⁾

La mayoría de los pacientes con COVID-19 presentan síntomas inespecíficos y signos respiratorios típicos, variando de leves a severos.⁽¹⁷⁾ Inicialmente, se caracterizan por presentar fiebre, tos y anosmia. Hay mialgia y fatiga aproximadamente en un 50% de los casos. Con menos frecuencia, hay odinofagia, cefalea, náuseas, anorexia, vómitos, dolor abdominal, miocarditis aguda, gastroenteritis,

diarrea, ageusia, eructos y reflujos. En los enfermos graves, se observa disnea, la cual puede progresar hasta la muerte.^(18,19)

Las principales anomalías de laboratorio son la linfopenia, leucocitosis con predominio de neutrófilos y trombocitopenia. Los pacientes que mueren debido a la virosis tienen una linfopenia mayor que los supervivientes o en aquellos con enfermedad leve, siendo el principal hallazgo en el 85% de los pacientes críticos y un marcador de mal pronóstico.⁽¹⁹⁾ Además, hay hipoalbuminemia y marcadores inflamatorios elevados, como la proteína C reactiva, lactato deshidrogenasa, velocidad de sedimentación globular, alanina transaminasa, aspartato aminotransferasa, creatinina, entre otras.⁽²⁰⁾

La prueba “Gold Standard” para identificar al SARS-CoV-2 es la PCR, siendo la más utilizada la PCR transcriptasa reversa en tiempo real (RT-qPCR). Tendría una sensibilidad y especificidad del 100%, no exenta de resultados erróneos. Para Yang y Zhao, la sensibilidad sería 70%. Describieron en muestras nasales, un 27% de falsos negativos y un 40% en muestras faríngeas. Estos resultados, se deben con mayor frecuencia a errores en la fase pre-analítica, a diferencia, de los falsos positivos, los cuales, son debido en mayor proporción al proceso analítico.⁽²¹⁾

En el año 2020, aparecieron test rápidos de inmunocromatografía para la detección del virus, que detectan IgG e IgM, que tienen alto rendimiento y son más

adecuadas para laboratorios de diagnóstico de mayor complejidad. La utilidad de los test está limitada por la respuesta inmune de cada individuo y se vería afectada por la posible pérdida de anticuerpos con el tiempo.⁽²²⁾

Las pruebas de detección rápida de antígenos (Ag-RDT), diagnostican la infección activa mediante el hallazgo de proteínas virales del SARS-CoV-2, en las secreciones respiratorias. A menudo, se detecta la proteína N de la nucleocápside del virus, debido a su abundancia y estructura conservada. También, detecta otras proteínas virales, como la proteína S. Proporcionan resultados entre 15-20 minutos. El virus se puede detectar dentro de los primeros 8 días después de la aparición de los síntomas, recomendando el uso de estos test dentro de este periodo de tiempo. En septiembre del 2020, la OMS recomendó una sensibilidad mínima del 80% y una especificidad del 97% para las pruebas de antígenos, en comparación con la RT-PCR.^(23,24)

La muestra de elección para este diagnóstico de COVID-19, es el hisopado nasofaríngeo, ya que la carga viral es superior en las fosas nasales que en la orofaringe. Los hisopos orales como método de recolección de la muestra probablemente sean aplicables en la detección temprana del virus, mientras que la de saliva, tiene la ventaja de una recolección más aceptable para los pacientes y más segura para los trabajadores de la salud. Hasta ahora, se ha informado de tres métodos para recolectar saliva: toser, hisopos de saliva y directamente de la glándula salival. Para aplicaciones clínicas, la saliva de la garganta profunda tiene la tasa positiva más alta, lo que puede representar un diagnóstico temprano de COVID-19. La saliva, directamente de las glándulas salivales, se asocia con la severidad de la enfermedad y posiblemente podría ser una prueba predictiva.⁽⁷⁾

Coinfecciones en pacientes con COVID-19

La tasa de mortalidad descrita por Botti, et al, es del 3,4% de los pacientes diagnosticados con COVID-19. Aproximadamente el 5% de estos, presentan SDRA grave y requieren ingreso en UCI. Los críticamente enfermos tienen una alta probabilidad (42%) de necesitar intubación prolongada, ventilación mecánica (VM) y posteriormente puede requerir traqueotomía.⁽²⁵⁾

Los estudios sobre coinfecciones por bacterias, hongos u otros virus en pacientes con COVID-19 son escasos, lo que puede deberse a que la mayoría de las publicaciones sobre este tema son recientes.⁽²⁶⁾

Las infecciones secundarias, son un factor importante que no puede ser ignorado en estos pacientes, principalmente, en aquellos que presentan comorbilidades como diabetes mellitus, hipertensión, obesidad, enfermedad cardiovascular y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los pacientes que presentan este tipo de condiciones tienen un mayor riesgo de enfermar gravemente y requerir ingreso en

la UCI, necesitando VM, nutrición parenteral, tratamiento antimicrobiano de amplio espectro, catéteres venosos centrales permanentes o vesicales, corticosteroides, entre otros. Una mayor hospitalización, los hace más propensos a desarrollar coinfecciones bacterianas o fúngicas.^(5,6)

Los datos clínicos muestran que la tasa de coinfección bacteriana o fúngica de los infectados por SARS-CoV-2 es menor, comparada con la de otras infecciones, por ejemplo, la del virus de la influenza.⁽⁵⁾ Esto, puede deberse a los pocos informes clínicos relevantes y al uso extenso de antibióticos en el diagnóstico temprano de la infección, y porque, los estudios sobre este tipo de infecciones son escasos, y en la mayoría de las publicaciones no se incluye un análisis de pronóstico, aun cuando se han encontrado infecciones secundarias en el 50% de los pacientes con COVID-19, no supervivientes. La cifra de coinfección bacteriana y fúngica con SARS-CoV-2 es proporcional a la gravedad de la enfermedad y esto irá deteriorando el estado de los pacientes.⁽¹⁹⁾

Los patógenos más frecuentes productores de coinfecciones incluyen bacterias, como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Acinetobacter baumannii*. Dentro de los hongos están, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus* y virus como el de la influenza A y B, *Coronavirus*, *Rinovirus/Enterovirus*, virus *Parainfluenza*, *Metapneumovirus humano* y virus de inmunodeficiencia humana (VIH).⁽²⁷⁾

Micosis en pacientes COVID-19

A partir del 2019, se han publicado artículos que hacen referencia a micosis oportunistas en pacientes críticos con COVID-19. Según algunos, parece haber una asociación entre estas dos patologías.⁽²⁸⁾

La Sociedad Francesa de Micología Médica, ha descrito, que las coinfecciones fúngicas invasivas en estos pacientes podrían estar siendo infra-diagnosticadas, y ha establecido que las enfermedades respiratorias crónicas, el tratamiento con corticosteroides, la tormenta de citoquinas y la intubación, son factores de riesgo para desarrollar micosis, llegando a tener una incidencia de 10-30%.⁽²⁹⁾

Las micosis presentan una amenaza adicional en la tarea de tratar a los pacientes con COVID-19, debido a que los hongos son una importante causa de morbilidad y mortalidad en inmunodeprimidos; como en el caso de una infección pulmonar grave que afecta a ambos lóbulos del pulmón, infecciones viscerales graves de dos o más sistemas orgánicos, incluidos los que afectan al SNC, infección sistémica multiorgánica de tres o más órganos, o fungemia.⁽³⁰⁾

Si bien, no se ha enfatizado en las infecciones secundarias en pacientes críticos con COVID-19, el impacto a largo plazo de estas coinfecciones puede llevar a la muerte del paciente, en particular aquellos que requieren VM o

que continúen necesitando terapia inmunomoduladora.⁽³¹⁾ También, debe darse la misma importancia a las infecciones pulmonares ocasionadas por hongos oportunistas, poco frecuentes, como *Histoplasma capsulatum*, *Mucor* spp y *Cryptococcus* spp. Se han informado pocos casos de mucoromicosis invasiva en pacientes con COVID-19. Recientemente, en India, se ha reportado un aumento explosivo de casos de esta afección altamente letal, que podría estar relacionada con el número de diabéticos y el uso de esteroides para el SARS-CoV-2.⁽³²⁾

Los enfermos con COVID-19 que se encuentran en estado crítico, presentan niveles más altos de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10), produciendo una disregulación en el sistema inmune, que afecta tanto a las células T helper 1 (Th1) y T helper 2 (Th2), siendo Th17 el subtipo más relevante. Estas células, actúan principalmente en la barrera de la mucosa pulmonar, produciendo y liberando interleucina-17 (IL-17), que contribuye a mejorar la organización de las células B y T en el tejido linfóide, asociado a los bronquios, interviniendo en la mediación de las respuestas inmunitarias secundarias, y la liberación de β -defensinas antifúngicas. Para esto, los pacientes con deficiencia en la producción o señalización de IL-17 parecen ser más susceptibles a micosis, además, de contribuir con la patología pulmonar, promoviendo la proliferación microbiana y una infección posterior. A su vez, aumenta el riesgo de infecciones fúngicas invasivas (IFI), tales como aspergilosis invasiva pulmonar (IPA), aspergilosis pulmonar asociada a COVID-19 (CAPA), candidiasis invasiva (IC) o neumonía por *Pneumocystis jirovecii*.⁽²⁶⁾

La IL-6 es responsable de causar daño pulmonar y la eventual falla multiorgánica en pacientes en estado crítico. Debido a esto, es necesario para el tratamiento la administración de Tocilizumab (anticuerpo monoclonal, humanizado, recombinante), contra el receptor de IL-6. Este fármaco disminuye los altos niveles de IL-6 para prevenir la disfunción multiorgánica causada por una tormenta de citocinas. Sin embargo, las consecuencias asociadas al tratamiento son el aumento del riesgo de infecciones bacterianas y fúngicas después de la terapia inmunosupresora, lo que incrementa el riesgo de producir CAPA. Aún no se ha estudiado completamente si el uso de terapias inmunomoduladoras y antibióticos podrían ser responsable del aumento de la susceptibilidad de los pacientes con COVID-19 y de la enfermedad micótica invasiva pulmonar.^(26,33)

En noviembre del 2020, fue notificada una neumonía por *Rhizopus azygosporus*, en un estadounidense, de 56 años, que había recibido metilprednisolona y tocilizumab como tratamiento. La administración de estos dos inmunosupresores probablemente contribuyó al riesgo de micosis.⁽³⁴⁾

***Aspergillus* spp.**

Los *Aspergillus*, son hongos ubicuos en el medio ambiente y causan infecciones en los humanos, incluida la IPA, la aspergilosis pulmonar crónica (CPA), la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), la rinosinusitis crónica, el asma fúngica, la bronquitis por *Aspergillus* spp. y CAPA.⁽³⁵⁾

La CAPA, afecta principalmente a pacientes de UCI con anomalías pulmonares graves. Los factores de riesgo descritos en estos casos, incluyen la edad avanzada, linfopenia, enfermedades respiratorias crónicas, terapia con corticosteroides, terapia antimicrobiana, VM o tormenta de citocinas. La mortalidad reportada para esta nueva entidad es del 65%.⁽³⁶⁾

Los datos sobre cambios patológicos en pacientes con SARS-CoV-2, son escasos. Se han informado lesiones alveolares difusas, incluida la formación de membranas hialinas combinadas con infiltración neutrofílica intraalveolar y congestión vascular. Estos daños histológicos podrían orientar a posibles infecciones secundarias como CAPA. Los pacientes bajo VM no comienzan inmediatamente con esta enfermedad; generalmente la colonización de *Aspergillus* spp., ocurre más tarde. En el caso de IPA, esta colonización sucede poco después de que el paciente se colocó bajo VM.⁽²⁶⁾

Se ha demostrado que las infecciones pulmonares virales graves se asocian con un mayor riesgo de IPA, aumentando la probabilidad de coinfecciones fúngicas en pacientes con COVID-19, con una alta incidencia en pacientes UCI.⁽³⁷⁾

Los factores de riesgo para producir IPA, incluyen neutropenia prolongada, EPOC, trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (alo-TCMH), trasplante de órganos sólidos (SOT), inmunodeficiencias hereditarias, enfermedades hematopoyéticas malignas (HM), fibrosis quística (FQ).⁽⁶⁾ Otro factor importante, es la liberación de patrones moleculares como citocinas pro-inflamatorias asociados a COVID-19, dando como resultado un daño epitelial pulmonar.⁽³⁵⁾

En pacientes con enfermedad pulmonar relacionada con COVID-19, se debe considerar realizar pruebas para detectar la presencia de *Aspergillus* spp., en las secreciones de las vías respiratorias inferiores y de galactomanano (GM) en muestras de suero consecutivas o lavado bronqueoalveolar (LBA). *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*, son los agentes más frecuentes⁽³⁸⁾ (Tabla 1).

Los criterios diagnósticos de consenso para la aspergilosis invasiva, a menudo no se cumplen en pacientes críticamente enfermos previamente inmunocompetentes, debido a la falta de factores de riesgo del huésped, confusión en la interpretación de las imágenes de tórax y la dificultad para realizar biopsias pulmonares en pacientes con VM invasiva.⁽³⁸⁾

Tabla 1 - Resumen de casos de aspergilosis asociadas a COVID-19

Autores	País	Microorganismo	Casos (%)
Van Someren G, et al., 2021 ⁽³⁹⁾	Holanda	• <i>A. fumigatus</i> (IPA)	1
Bartoletti, et al., 2020 ⁽⁵⁵⁾	Italia	• <i>Aspergillus</i> spp. (CAPA)	30 (27,7%)
Gangneux, et al., 2020 ⁽⁵⁶⁾	Francia	• <i>Aspergillus</i> spp. (IPA)	15 (33%)
Alanio, et al., 2020 ⁽⁵⁷⁾	Francia	• <i>Aspergillus</i> spp. (CAPA)	29 (33%)
Nasir, et al., 2020 ⁽⁵⁸⁾	Pakistán	• <i>Aspergillus</i> spp. (CAPA) (colonizados)	5 (22%) 4 (17%)
Wang, et al., 2020 ⁽⁵⁹⁾	China	• <i>A. fumigatus</i> (IPA)	8 (8%)
Rutsaert, et al., 2020 ⁽⁶⁰⁾	Bélgica	• <i>Aspergillus</i> spp. (CAPA)	7 (35%)
Van Arkel A, et al., 2020 ⁽⁶¹⁾	Holanda	• <i>A. fumigatus</i> (CAPA)	5 (45%)
Koehler, et al., 2020 ⁽⁶²⁾	Alemania	• <i>A. fumigatus</i> (CAPA)	5 (26%)
Blaize, et al., 2020 ⁽⁶³⁾	Francia	• <i>A. fumigatus</i>	1
Lescure, et al., 2020 ⁽⁶⁴⁾	Francia	• <i>A. flavus</i> (CAPA)	1 (20%)
Antinori, et al., 2020 ⁽⁶⁵⁾	Italia	• <i>A. fumigatus</i> (IPA)	1
Meijer, et al., 2020 ⁽⁶⁶⁾	Holanda	• <i>A. fumigatus</i> (CAPA)	1
Prattes, et al., 2021 ⁽³⁷⁾	Austria	• <i>Aspergillus fumigatus</i> (IPA)	1
Fernández, et al., 2021 ⁽⁶⁷⁾	Argentina	• <i>A. flavus</i> (IPA)	1
Santana, et al., 2020 ⁽⁶⁸⁾	Brasil	• <i>A. penicilliioides</i> (IPA)	1
Sharma, et al., 2021 ⁽⁶⁹⁾	Australia	• <i>A. fumigatus</i> (CAPA)	1
Hughes, et al., 2020 ⁽⁷⁰⁾	Inglaterra	• <i>A. fumigatus</i>	3 (2,6%)
Zhu X, et al., 2020 ⁽⁷¹⁾	China	• <i>Aspergillus</i> spp.	60 (23,3%)
Yang X, et al., 2020 ⁽⁷²⁾	China	• <i>A. flavus</i> • <i>A. fumigatus</i>	1 (1,9%) 1 (1,9%)
Freire, et al., 2020 ⁽⁷³⁾	Brasil	• <i>A. penicilliioides</i> (IPA)	1

IPA: Aspergilosis pulmonar invasiva, CAPA: Aspergilosis asociada a COVID-19. Fuente: Elaboración propia.

Uno de los primeros casos de IPA por *A. fumigatus*, comprobada, en un paciente con COVID-19, fue en un varón de 79 años, con diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, fibrilación auricular paroxística e insuficiencia cardíaca crónica, en un hospital de Amstelveen, Holanda⁽³⁹⁾ (Tabla 1).

El diagnóstico para CAPA e IPA, se basa en la detección de pruebas positivas de GM y 1,3-β-d-glucano (BDG) en suero, evidencia histopatológica y crecimiento de *Aspergillus* spp. en cultivo. El GM de LBA es importante para diagnosticar a estos pacientes, observándose niveles altos en aquellos con presunta IPA, así como, la sospecha clínica primaria para una terapia antimicótica adecuada y dirigida con los protocolos nacionales e internacionales.^(40,41)

Algunos métodos de diagnóstico para apoyar el reconocimiento de estas micosis son la tomografía computarizada, la biopsia y la broncoscopia. Esta última, está indicada en pacientes críticamente enfermos, ya que, junto con la biopsia se consideran métodos invasivos.⁽⁴²⁾

Candida spp.

Las especies de *Candida*, son la causa más importante de micosis oportunistas en el mundo. Constituyen un problema

de salud pública, con una alta mortalidad cuando se complica con shock séptico.⁽⁴³⁾ Estas levaduras se encuentran en superficies mucosas y cutáneas del cuerpo humano. Pocas especies están asociadas con la enfermedad, que incluyen a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. dubliniensis*. La especie más aislada sigue siendo *C. albicans*.⁽⁴⁴⁾

En pacientes graves con COVID-19, la candidiasis orofaríngea (OPC) podría ser una causa probable de morbilidad en estos, la que comienza con la colonización de *Candida* spp. en la mucosa oral. Los enfermos pueden sentir malestar local, una sensación alterada del gusto, ardor bucal, glosodinia, disfagia y dificultad para respirar. En la mayoría de los casos, esta candidiasis se adquiere de forma endógena, cuando el paciente está inmunodeprimido.⁽⁴⁵⁾

En un estudio, en la Universidad de Ciencias Médicas de Teherán, Irán, se investigaron 53 pacientes hospitalizados con COVID-19 y OPC, encontrando que *C. albicans* era el patógeno más común, representando el 70,7%, seguido de *C. glabrata* 10,7%, *C. dubliniensis* 9,2%, *C. parapsilosis sensu stricto* 4,6%, *C. tropicalis* 3% y *C. krusei* 1,5%⁽⁵⁾ (Tabla 2).

Tabla 2 - Resumen de casos de candidiasis asociadas a COVID-19.

Autores y referencias	País	Microorganismo	Casos (%)
Salehi et al. 2020 ⁽⁵⁾	Irán	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. parapsilosis sensu strictus</i> <i>C. tropicalis</i> (OPC)	46 (70,7%) 7 (10,7%) 6 (9,2%) 3 (4,6%) 2 (3%)
Chowdhary et al. 2020 ⁽⁷⁴⁾	India	<i>C. auris</i> <i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>Candida krusei</i> (Candidemia)	10 (67%) 3 (20%) 1 (6,6%) 1 (6,6%)
Hughes et al. 2020 ⁽⁷⁰⁾	Inglaterra	<i>C. albicans</i> (Candidemia)	3 (2,7%)
Zhu X et al. 2020 ⁽⁷¹⁾	China	<i>C. albicans</i> (Candidemia)	2 (0,8%)
Chen N et al. 2020 ⁽⁷⁵⁾	China	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>	3 (3%) 1 (1%)
Almeida et al. 2021 ⁽⁴⁷⁾	Brasil	<i>C. auris</i> (Colonizados)	11

OPC: Candidiasis orofaríngea. Fuente: Elaboración propia.

La candidiasis invasiva es rara, pero se asocia con mortalidad alta en los enfermos críticos, tratados con antimicrobianos de amplio espectro, nutrición parenteral y exámenes invasivos, o en aquellos con neutropenia prolongada y deterioro inmunológico. En estos, el riesgo de infección por especies de *Candida* puede aumentar significativamente, surgiendo la necesidad de un reconocimiento temprano de la micosis, de terapia antifúngica y una intervención adecuada, que son requisitos básicos para mejorar el resultado en los pacientes en UCI.^(6,46)

Hay especies de *Candida* que se aíslan en menor frecuencia, como *Candida auris*. En Brasil, en Bahía, en el año 2020, se encontraron los primeros cultivos de pacientes en un hospital terciario, mostrando crecimiento de *C. auris*⁽⁴⁷⁾ (Tabla 2). Esta especie fue diferenciada de otras por MALDI-TOF, en un grupo de pacientes hospitalizados en UCI COVID-19. La identificación mostró un nivel de confianza del 99,9%.⁽⁴⁷⁾ Esta técnica, se ha utilizado con éxito en entornos clínicos, como herramienta de diagnóstico para detectar bacterias, hongos y virus, y su patogénesis, pudiendo identificar también al SARS-CoV-2.⁽⁴⁸⁾

Hay que tener en consideración otros microorganismos en Latinoamérica, ya que, a medida que avanza COVID-19, se podrían presentar casos de micosis endémica. En Argentina, en el 2020, una mujer de 36 años, con VIH, ingresó a un servicio de urgencias, tras sufrir 15 días de disnea, tos y sudores nocturnos. En la paciente se encontró *Histoplasma capsulatum* y la RT-PCR fue negativa para SARS-CoV-2. Después de 7 días de tratamiento, la prueba fue positiva y la paciente fue trasladada a una sala de COVID-19.⁽⁴⁹⁾ En Brasil, un varón de 43 años, con infección por VIH, presentaba los mismos síntomas que el caso anterior. Cuarenta y ocho horas, después del

ingreso del paciente, en su cultivo de piel y hemocultivo de una muestra previa, hubo crecimiento de *Histoplasma capsulatum* y se obtuvo un resultado positivo de RT-PCR para SARS-CoV-2, a partir de la muestra tomada al ingreso hospitalario.⁽⁵⁰⁾

Existe un alto riesgo de propagación del SARS-CoV-2 en los centros hospitalarios, por lo que el CDC actualiza constantemente las recomendaciones para el control de la infección. Asimismo, hay que fortalecer las prácticas estándares de control de infecciones hospitalarias, teniendo como objetivo reducir la propagación nosocomial.⁽⁴⁹⁾ A partir de mayo de 2021, hay informes de numerosos casos de COVID-19, en la India, otros en Brasil, Paraguay, Uruguay, México asociados a mucormicosis, en diabéticos o con tratamiento con corticoides, parte de los cuales han sido revisados por Singh et al.⁽⁵¹⁾

Es importante destacar la labor invisible de los Laboratoristas clínicos (Tecnólogos Médicos, Biomédicos, Farmacéuticos, Médicos Laboratoristas) en la actual pandemia para detectar al SARS-CoV-2, ya que son estos profesionales quienes realizan los exámenes de PCR para el diagnóstico de COVID-19. El primer caso descrito en Chile, en Talca, fue realizado por un Tecnólogo médico.^(52,53)

En Chile, hay más de 130 laboratorios que realizan PCR, informando resultados de exámenes de COVID-19, en todas las regiones del país. La implementación de estos laboratorios en distintos países que realicen PCR, tiene un efecto positivo, al permitir ejecutar exámenes por esta técnica que probablemente no habrían sido implementados si no fuese por la pandemia.

En Chile, en la ciudad de Valparaíso, Cruz R, et al, evidenció un aumento de la positividad del biomarcador GM durante el año 2019-2020, viéndose un incremento de

solicitudes de este marcador en muestra de LBA, lo que demostró un acrecentamiento de las micosis en pacientes críticos en la pandemia de COVID-19.⁽⁵⁴⁾

Es necesario mejorar los flujogramas para el diagnóstico de la coinfección en estos pacientes, para tener una sospecha oportuna, proporcionando un tratamiento eficiente y, además; de mantener a la población informada, adheriéndose a las normas sanitarias para fortalecer la prevención de la COVID-19 y de infecciones secundarias.

Abstract

The global outbreak of SARS-CoV-2, described as of 2019 whose expansion caused the COVID-19 pandemic, has created a risk to people's health, presenting itself as a threat to life and an international public health emergency, which to the date cannot be controlled. Coinfection in these patients, by viruses, bacteria and fungi, increases the difficulty of diagnosis, treatment and prognosis of the disease. It's important to deepen the knowledge about the SARS-CoV-2 virus and the co-infections that could occur, in particular, in patients with COVID-19 who present with mycosis. The objective of this bibliographic review is to determine the importance of mycosis, as an opportunistic disease, in patients affected by SARS-CoV-2. A systematic bibliographic review was carried out in the "PubMed-NCBI" database, using the keywords and / or headings: "COVID-19", "SARS-CoV-2", "Coronavirus", "COVID-19 and coinfection", "Mycosis", "Aspergillus spp.", "Candida spp." COVID-19 and Aspergillus spp., "COVID-19 and Candida spp.". From the analysis of the literature, one can conclude the importance of respiratory mycoses, caused by various fungal pathogens in patients with COVID-19. The disease was described in 2019 and there is few a information on cases and their management, making it necessary to strengthen the investigation of coinfection in these patients, in order to improve the flow charts of clinical suspicion, contributing to diagnoses, accurate treatments and promoting prevention against to this pandemic.

Keywords

SARS-CoV-2; Immunosuppression; Coinfection; Aspergillus spp.; Candida spp.

BIBLIOGRAFÍA

- Esakandari H, Nabi-Afjadi M, Fakkari-Afjadi J, Farahmandian N, Miresmaeili SM, Bahreini E. A comprehensive review of COVID-19 characteristics. *Biol Proced Online*. 2020; 22(1):19.
- Pascarella G, Strumia A, Piliengo C, Bruno F, Del Buono R, Costa F, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J Intern Med*. 2020; 288(2):192-206.
- Selene Fernández Hernández, Rosa Elena Sarmiento Silva, María Elena Trujillo Ortega. Coronavirus en las diferentes especies. *porcicultura.com*. Jul 6;2020. Available from: <https://www.porcicultura.com/destacado/Coronavirus-en-las-diferentes-especies>
- Zhang XY, Huang HJ, Zhuang DL, Nasser MI, Yang MH, Zhu P, Zhao MY. Biological, clinical and epidemiological features of COVID-19, SARS and MERS and AutoDock simulation of ACE2. *Infect Dis Poverty*. 2020;9(1):99.
- Chen X, Liao B, Cheng L, Peng X, Xu X, Li Y, Hu T, Li J, Zhou X, Ren B. The microbial coinfection in COVID-19. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(18):7777-7785.
- Song G, Liang G, Liu W. Fungal Co-infections Associated with Global COVID-19 Pandemic: A Clinical and Diagnostic Perspective from China. *Mycopathologia*. 2020;185(4):599-606.
- Xu R, Cui B, Duan X, Zhang P, Zhou X, Yuan Q. Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV. *Int J Oral Sci*. 2020;12(1):11-12.
- Deshmukh V, Tripathi SC, Pandey A, Deshmukh V, Vykoukal J, Patil A, Sontakke B. COVID-19: a conundrum to decipher. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(10):5830-5841.
- Vellas C, Delobel P, de Souto Barreto P, Izopet J. COVID-19, Virology and Geroscience: A Perspective. *J Nutr Health Aging*. 2020;24(7):685-691.
- Kannan S, Shaik Syed Ali P, Sheeza A, Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) - recent trends. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(4):2006-2011.
- Fernández-Rodríguez A, Casas I, Culebras E, Morilla E, Cohen MC, Alberola J. COVID-19 y estudios microbiológicos post mortem. *Rev Española Med Leg*. 2020;46(3):127-138.
- ChemEvol. Introducción a la biología molecular del Coronavirus SARS-CoV-2. *Biología Molecular, Evolución Química y Astrobiología*. Jul 8, 2020. Available from: <http://www3.uah.es/chemevol/index.php/introduccion-a-la-biologia-molecular-del-coronavirus-sars-cov-2/>
- Lee I-C, Huo T-I, Huang Y-H. Gastrointestinal and liver manifestations in patients with COVID-19. *J Chin Med Assoc*. 2020;83(6):521-523.
- Sanz JM, Gómez Lahoz AM, Martín RO. Papel del sistema inmune en la infección por el SARS-CoV-2: inmunopatología de la COVID-19 [Role of the immune system in SARS-CoV-2 infection: immunopathology of COVID-19]. *Medicine (Madrid)*. 2021;13(33):1917-1931.
- García-Salido A. Revisión narrativa sobre la respuesta inmunitaria frente a coronavirus: descripción general, aplicabilidad para SARS-CoV-2 e implicaciones terapéuticas [Narrative review of the immune response against coronavirus: An overview, applicability for SARS-CoV-2, and therapeutic implications]. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2020;93(1):60.e1-60.e7.
- Salehi M, Ahmadi K, Badali H, Khodavaisy S. Opportunistic Fungal Infections in the Epidemic Area of COVID-19: A Clinical and Diagnostic Perspective from Iran. *Mycopathologia*. 2020;185(4):607-611.
- Oliveira BA, Oliveira LC de, Sabino EC, Okay TS. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2020;62:e44.
- Berger JR. COVID-19 and the nervous system. *J Neurovirol*. 2020;26(2):143-148.
- Schmulson M, Dávalos MF, Berumen J. Beware: Gastrointestinal symptoms can be a manifestation of COVID-19. *Rev Gastroenterol Mex*. 2020;85(3):282-287.
- Rodríguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguín-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*. 2020;34:101623.
- Accini Mendoza JL, Nieto Estrada VH, Beltrán López N, Ramos Bolaños E, Molano Franco D, Dueñas Castell C, Valencia Moreno AA, Alarcón Amaya IC, Serna Flórez J, Gil Valencia BA, Pizarro C, Zabaleta Polo YM, Chica Meza CL. Actualización de la Declaración de consenso en medicina crítica para la atención multidisciplinaria del paciente con sospecha o confirmación diagnóstica de COVID-19. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo*. 2020;20:1-112.
- Batra R, Olivieri LG, Rubin D, Vallari A, Pearce S, Olivo A, et al. A comparative evaluation between the Abbott Panbio™ COVID-19 IgG/IgM rapid test device and Abbott Architect™ SARS CoV-2 IgG assay. *J Clin Virol*. 2020;132:104645.
- Peeling RW, Olliaro PL, Boeras DI, Fongwen N. Scaling up COVID-19 rapid antigen tests: promises and challenges. *Lancet Infect Dis*. 2021;S1473-3099(21)00048-7.
- Mboumba Bouassa R-S, Veyer D, Péré H, Bélec L. Analytical performances of the point-of-care SIENNATM COVID-19 Antigen Rapid Test for the detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in nasopharyngeal swabs: A prospective evaluation during the COVID-19 second wave in France. *Int J Infect Dis*. 2021;106:8-12.
- Botti C, Lusetti F, Neri T, Peroni S, Castellucci A, Salsi P, et al. Comparison of percutaneous dilatational tracheotomy versus open surgical technique in severe COVID-19: Complication rates, relative risks and benefits. *Auris Nasus Larynx*. 2021;48(3):511-517.

26. Pemán J, Ruiz-Gaitán A, García-Vidal C, Salavert M, Ramírez P, Puchades F, et al. Fungal co-infection in COVID-19 patients: Should we be concerned? *Rev Iberoam Micol.* 2020;37(2):41-46.
27. Lai C-C, Wang C-Y, Hsueh P-R. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *J Microbiol Immunol Infect.* 2020;53(4):505-512.
28. Agrifoglio A, Cachafeiro L, Figueira JC, Añón JM, García de Lorenzo A. Critically ill patients with COVID-19 and candidaemia: We must keep this in mind. *J Mycol Med.* 2020;30(4):101012.
29. Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2020;81(2):266-275.
30. Yamazaki T, Kume H, Murase S, Yamashita E, Arisawa M. Epidemiology of visceral mycoses: analysis of data in annual of the pathological autopsy cases in Japan. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1732-1738.
31. Zhang H, Zhang Y, Wu J, Li Y, Zhou X, Li X, et al. Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):1958-1964.
32. Grens K. Infección fúngica rara que afecta a pacientes con COVID-19 en la India. TheScientist explorando la vida, inspirando innovación. May 11, 2021. Available from: <https://www.the-scientist.com/news-opinion/rare-fungal-infection-affecting-covid-19-patients-in-india>
33. Deana C, Vetrugno L, Bassi F, De Monte A. Tocilizumab administration in COVID-19 patients: Water on the fire or gasoline? *Med Mycol Case Rep.* 2021;31:32-34.
34. Kanwar A, Jordan A, Olewiler S, Wehberg K, Cortes M, Jackson BR. A Fatal Case of *Rhizopus azygosporus* Pneumonia Following COVID-19. *J fungi (Basel, Switzerland).* 2021;7(3):174.
35. Arastehfar A, Carvalho A, van de Veerdonk FL, Jenks JD, Koehler P, Krause R, et al. COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA) — From Immunology to Treatment. *J Fungi.* 2020;6(2):91.
36. Machado M, Valerio M, Álvarez-Uría A, Olmedo M, Veintimilla C, Padilla B, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in the COVID-19 era: An expected new entity. *Mycoses.* 2021;64(2):132-143.
37. Prattes J, Valentin T, Hoenigl M, Talakic E, Reisinger AC, Eller P. Invasive pulmonary aspergillosis complicating COVID-19 in the ICU - A case report. *Med Mycol Case Rep.* 2021;31:2-5.
38. Verweij PE, Gangneux JP, Bassetti M, Brüggemann RJM, Cornely OA, Koehler P, Lass-Flörl C, van de Veerdonk FL, Chakrabarti A, Hoenigl M; 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;1(2):e53-e55.
39. Van Someren Gréve F, du Long R, Talwar R, Beurskens CJP, Voerman HJ, van Dijk K. Proven Fatal Invasive Aspergillosis in a Patient with COVID-19 and *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *J Fungi.* 2021;7(3):230.
40. Borman AM, Palmer MD, Fraser M, Patterson Z, Mann C, Oliver D, Linton CJ, Gough M, Brown P, Dzietczyk A, Hedley M, McLachlan S, King J, Johnson EM. COVID-19-Associated Invasive Aspergillosis: Data from the UK National Mycology Reference Laboratory. *J Clin Microbiol.* 2020;59(1):e02136-20.
41. García-Salido A. Revisión narrativa sobre la respuesta inmunitaria frente a coronavirus: descripción general, aplicabilidad para SARS-CoV-2 e implicaciones terapéuticas [Narrative review of the immune response against coronavirus: An overview, applicability for SARS-CoV-2, and therapeutic implications]. *An Pediatr (Engl Ed).* 2020;93(1):60.e1-60.e7.
42. Segrelles-Calvo G, de Araújo GR, Frases S. Systemic mycoses: a potential alert for complications in COVID-19 patients. *Future Microbiol.* 2020;15(14):1405-1413.
43. Fidler G, Leiter E, Kocsube S, Biro S, Pahlcsek M. Validation of a simplex PCR assay enabling reliable identification of clinically relevant *Candida* species. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):393.
44. Whibley N, Gaffen SL. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. *Cytokine.* 2015;76(1):42-52.
45. Salehi M, Ahmadikia K, Mahmoudi S, Kalantari S, Jamalimoghadamsiahkali S, Izadi A, et al. Oropharyngeal candidiasis in hospitalised COVID-19 patients from Iran: Species identification and antifungal susceptibility pattern. *Mycoses.* 2020;63(8):771-778.
46. Al-Hatmi AMS, Mohsin J, Al-Huraizi A, Khamis F. COVID-19 associated invasive candidiasis. *J Infect.* 2021;82(2):e45-e46.
47. Almeida JN, Francisco EC, Hagen F, Brandão IB, Pereira FM, Presta Dias PH, et al. Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. *J Fungi.* 2021;7(3):220.
48. Mahmud I, Garrett TJ. Mass Spectrometry Techniques in Emerging Pathogens Studies: COVID-19 Perspectives. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2020;31(10):2013-2024.
49. Messina FA, Marin E, Caceres DH, Romero M, Depardo R, Priarone MM, et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Patient with Disseminated Histoplasmosis and HIV-A Case Report from Argentina and Literature Review. *J fungi (Basel, Switzerland).* 2020;6(4):275.
50. Bertolini M, Mutti MF, Barletta JAE, Falak A, Cuatz D, Sisto A, et al. COVID-19 associated with AIDS-related disseminated histoplasmosis: a case report. *Int J STD AIDS.* 2020;31(12):1222-1224.
51. Singh AK, Singh R, Joshi SR, Misra A. Mucormycosis in COVID-19: Asystematic review of cases reported worldwide and in India, Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews. 2021;15(4):102146.
52. Clínicas de Chile A.G. Dimensionamiento del sector de salud privado en Chile. 2016;1(69):1-108.
53. Superintendencia de Salud. Estadísticas de Prestadores Individuales de Salud. *Supt Salud.* 2019;1(5):1-10.
54. Choappa RC, Vieille P, Leiva Y, Noguera M. Aumento en la positividad del biomarcador galactomanano durante la pandemia de COVID-19 en la Quinta Región: Valparaíso. 2021;38(3):340-343.
55. Bortoletti M, Tonascia R, Cricca M, Rinaldi M, Maccaro A, Bussini L, Fornaro G, Tonetti T, Pizzilli G, Francelanci E, Giuntoli L, Rubin A, Moroni A, Ambretti S, Trapani F, Vatamanu O, Ranieri VM, Castelli A, Baiocchi M, Lewis R, Giannella M, Viale P; PREDICO study group. Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis among COVID-19 intubated patients: a prospective study. *Clin Infect Dis.* 2020;1065.
56. Gangneux JP, Reizine F, Guegan H, Pinceaux K, Le Balch P, Prat E, Pelletier R, Belaz S, Le Souhaitier M, Le Tulzo Y, Seguin P, Lederlin M, Tadié JM, Robert-Gangneux F. Is the COVID-19 Pandemic a Good Time to Include *Aspergillus* Molecular Detection to Categorize Aspergillosis in ICU Patients? A Monocentric Experience. *J Fungi (Basel).* 2020;6(3):105.
57. Alanio A, Dellièvre S, Fodil S, Bretagne S, Mégarbane B. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. *Lancet Respir Med.* 2020;8(6):e48-e49.
58. Nasir N, Farooqi J, Mahmood SF, Jabeen K. COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA) in patients admitted with severe COVID-19 pneumonia: An observational study from Pakistan. *Mycoses.* 2020;63(8):766-770.
59. Wang J, Yang Q, Zhang P, Sheng J, Zhou J, Qu T. Clinical characteristics of invasive pulmonary aspergillosis in patients with COVID-19 in Zhejiang, China: a retrospective case series. *Crit Care.* 2020;24(1):299.
60. Rutsaert L, Steinfert N, Van Hunsel T, Bomans P, Naesens R, Mertes H, Dits H, Van Regenmortel N. COVID-19-associated invasive pulmonary aspergillosis. *Ann Intensive Care.* 2020;10(1):71.
61. Van Arkel ALE, Rijpstra TA, Belderbos HNA, van Wijngaarden P, Verweij PE, Bentvelsen RG. COVID-19-associated Pulmonary Aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202(1):132-135.

62. Koehler P, Cornely OA, Böttiger BW, Dusse F, Eichenauer DA, Fuchs F, Hallek M, Jung N, Klein F, Persigehl T, Rybníček J, Kochanek M, Böll B, Shimabukuro-Vornhagen A. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 2020;63(6):528-534.
63. Blaize M, Mayaux J, Nabet C, Lampros A, Marcelin A-G, Thellier M, et al. Fatal Invasive Aspergillosis and Coronavirus Disease in an Immunocompetent Patient. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(7):1636-1637.
64. Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky PH, Behillil S, Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Donati F, Le Hingrat Q, Enouf V, Houhou-Fidouh N, Valette M, Mailles A, Lucet JC, Mentre F, Duval X, Descamps D, Malvy D, Timsit JF, Lina B, vander-Werf S, Yazdanpanah Y. Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(6):697-706.
65. Antinori S, Rech R, Galimberti L, Castelli A, Angeli E, Fossali T, Bernasconi D, Covizzi A, Bonazzetti C, Torre A, Carsana L, Tonello C, Zerbi P, Nebuloni M. Invasive pulmonary aspergillosis complicating SARS-CoV-2 pneumonia: A diagnostic challenge. *Travel Med Infect Dis*. 2020;38:101752.
66. Meijer EFJ, Dofferhoff ASM, Hoiting O, Buil JB, Meis JF. Azole-Resistant COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis in an Immunocompetent Host: A Case Report. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(2):79.
67. Fernandez NB, Caceres DH, Beer KD, Irrazabal C, Delgado G, Farias L, Chiller TM, Verweij PE, Stecher D. Ventilator-associated pneumonia involving *Aspergillus flavus* in a patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19) from Argentina. *Med Mycol Case Rep*. 2021;31:19-23.
68. Santana MF, Pivoto G, Alexandre MAA, Baía-da-Silva DC, Borba MGDS, Val FA, Brito-Sousa JD, Melo GC, Monteiro WM, Souza JVB, Pinheiro SB, Ferreira LCL, Naveca FG, Nascimento VA, Corado ALG, Hajjar LA, Silva Neto JR, Siva GAV, Pasqualotto AC, Lacerda MVG. Confirmed Invasive Pulmonary Aspergillosis and COVID-19: the value of postmortem findings to support antemortem management. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53:e20200401.
69. Sharma A, Hofmeyr A, Bansal A, Thakkar D, Lam L, Harrington Z, Bhonagiri D. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA): An Australian case report. *Med Mycol Case Rep*. 2021;31:6-10.
70. 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;26(10):1395-1399.
71. Zhu X, Ge Y, Wu T, Zhao K, Chen Y, Wu B, Zhu F, Zhu B, Cui L. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Res*. 2020;285:198005.
72. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, Wu Y, Zhang L, Yu Z, Fang M, Yu T, Wang Y, Pan S, Zou X, Yuan S, Shang Y. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. 2020;8(5):475-481.
73. Santana MF, Pivoto G, Alexandre MAA, Baía-da-Silva DC, Borba MGDS, Val FA, Brito-Sousa JD, Melo GC, Monteiro WM, Souza JVB, Pinheiro SB, Ferreira LCL, Naveca FG, Nascimento VA, Corado ALG, Hajjar LA, Silva Neto JR, Siva GAV, Pasqualotto AC, Lacerda MVG. Confirmed Invasive Pulmonary Aspergillosis and COVID-19: the value of postmortem findings to support antemortem management. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53:e20200401.
74. Chowdhary A, Tarai B, Singh A, Sharma A. Multidrug-Resistant *Candida auris* Infections in Critically Ill Coronavirus Disease Patients, India, April-July 2020. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(11):2694-2696.
75. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X, Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507-513.

Correspondência

Luis Zaror

*Escuela de Tecnología Médica,
Facultad de Ciencias, Universidad Mayor,
Temuco-Chile. Avenida Alemania N° 281
Temuco-Chile, e-mail: lzaror@yahoo.es*

Imunomodulação causada por parasitoses oportunistas em casos de COVID-19: um breve estudo

Immunomodulation caused by opportunistic parasites in COVID-19 cases: a brief report

Lillian O. P. Silva¹

Joseli M. R. Nogueira²

Resumo

Até o presente momento, foram notificadas mais de 550 mil mortes causadas por COVID-19 no Brasil. Estimulada pelo SARS-Cov-2, a formação de um inflamassoma causa um processo inflamatório sistêmico, responsável pela progressão da enfermidade, e ainda favorece o surgimento de doenças oportunistas, como as parasitoses, que são excelentes moduladoras do sistema imunológico, induzindo uma tolerância do organismo através do equilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A partir disso, um levantamento bibliográfico foi realizado com o objetivo de avaliar a possível relação imunomoduladora das infecções parasitárias na COVID-19. Há uma extensa discussão quanto à presença de parasitoses concomitantes a esta coronavirose, devido à possibilidade de modulação do sistema imunológico, que pode ser capaz de refrear ou intensificar a progressão da COVID-19, bem como interferir na soroconversão pós-vacina dos indivíduos afetados, uma vez que doenças diretamente relacionadas aos processos inflamatórios, como *Diabetes mellitus* do tipo 2, tornam estes indivíduos mais susceptíveis às formas mais graves desta pandemia. Sendo assim, ainda que alguns autores sugiram a possibilidade da helmintíase experimental como uma alternativa para a imunomodulação, trata-se de uma ideia controversa, que necessita de maiores estudos para avaliar se tal procedimento seria seguro e viável de ser aplicado ou não.

Palavras-chave

COVID-19; Imunomodulação; Parasitoses oportunistas

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, a cidade de Wuhan (China) notificou um surto de pneumonias com causa desconhecida. Mais tarde, o coronavírus SARS-Cov-2 foi identificado como causador de uma síndrome respiratória aguda grave, sendo o terceiro vírus da família *Coronaviridae* conhecido neste século que é responsável por uma pneumonia de extrema letalidade, tendo como antecessores o MERS-Cov e o SARS-Cov. Em março de 2020, essa patologia, denominada COVID-19, foi declarada como uma pandemia pela Organização Mundial de Saúde, devido a sua disseminação extremamente rápida.^(1,2,3)

O SARS-Cov-2 é um vírus zoonótico esférico, pertencente à família *Coronaviridae*, constituído de uma fita simples de RNA, apresentando quatro genes principais, responsáveis pela codificação das proteínas de nucleocapsídeo, proteínas

de membrana, glicoproteínas de membrana e a proteína Spike, que é a responsável pela capacidade de invasão celular do vírus, uma vez que se trata de uma proteína com duas subunidades, sendo capaz de reconhecer o receptor e se fundir à membrana celular.^(4,5)

Até o presente momento, agosto de 2021, já foram mais de 550 mil óbitos causados por essa coronavirose no Brasil e cerca de 3,45 milhões em todo o mundo.⁽⁶⁾ Contudo, a OMS acredita que o número de mortes pode ser até três vezes maior do que o divulgado nos dados oficiais, devido à subnotificação dos mesmos e à dificuldade das autoridades sanitárias para apurar todos os casos.⁽⁷⁾ A COVID-19 apresenta um grande espectro de manifestações clínicas, que podem ser diretamente relacionadas à “chuva de citocinas” estimulada pelo vírus, também conhecida como inflamassoma, um complexo multiproteico capaz de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias.⁽⁸⁾

¹ Mestranda do PPGSPMA - Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ – Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

² Chefe do Laboratório de Microbiologia – DCB - Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ – Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100962

Ao saírem do controle, essas moléculas desencadeiam um processo inflamatório sistêmico em cascata, oriundo da presença de macrófagos e monócitos infectados pelo SARS-Cov-2, o que acarreta a liberação de IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, TNF- α e Casp1p20, exacerbando a resposta inflamatória normal de defesa, sendo característico da forma grave da doença em questão, onde, muitas vezes, pode levar o paciente à falência múltipla dos órgãos e até mesmo à morte. Essa alteração da cascata imunológica permite que a COVID-19 avance de formas assintomáticas ou oligossintomáticas para uma doença grave e de péssimo prognóstico. Além disso, o aumento dos níveis de IL-6 no sangue dos pacientes foi diretamente associado ao risco de morte dos indivíduos.^(8,9,10,11)

É válido ressaltar que há uma relação direta entre doenças infecciosas e parasitárias, neste caso, entre os parasitas e a COVID-19, pois doenças causadas por vírus, como dito anteriormente, são capazes de interferir no sistema imunológico através do inflamassoma, o que favorece o surgimento de outras infecções, desta vez, causadas por fungos, protozoários e helmintos.⁽¹²⁾ Por outro lado, os parasitas são excelentes moduladores da resposta imunológica, uma vez que induzem uma tolerância do organismo ao invasor através do equilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, cujo potencial vem sendo explorado no tratamento de esclerose múltipla e doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa, por exemplo.^(13,14,15)

Fundamentado nestas informações, este artigo teve como objetivo avaliar, com base na literatura, a relação imunomoduladora das infecções parasitárias com a COVID-19 e o seu possível impacto na saúde do paciente.

MATERIAIS E MÉTODOS

As buscas bibliográficas foram realizadas em bases de dados, como o Portal Periódicos CAPES e o PUBMED, disponíveis em <https://www-periodicos-capes-gov-br/> e <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, respectivamente. Ao finalizar as pesquisas, as referências duplicadas foram excluídas. Foram abarcados artigos publicados nos últimos cinco anos, preferencialmente entre 2020 e 2021, período correspondente ao início da pandemia no Brasil até os dias atuais, em inglês, português ou espanhol. Devido a diferenças nos processos de indexação nas bases de dados bibliográficas, optou-se pela busca por termos livres, sem o uso de vocabulário controlado (descritores).

Com essa estratégia, houve uma recuperação de um número maior de referências, garantindo a detecção da maioria dos trabalhos publicados dentro dos critérios preestabelecidos. Os termos “Parasitoses oportunistas”, “COVID-19”, “Pandemia”, “SARS-Cov-2”, “Infecções parasitárias”, “Parasitoses” e suas respectivas traduções para o inglês foram combinados com as associações e desfechos de interesse nas três primeiras páginas de cada portal.

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

Os helmintos estão entre as principais infecções parasitárias. Casos de esquistossomose e outras doenças causadas por helmintos transmitidos pelo solo (HTS), como tricurias, ancilostomíases e ascaridíase, são extremamente comuns em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos. Tais parasitos são capazes de regular a resposta imunológica do paciente, através da ativação de células T reguladoras, células do tipo TH₂ ou ambas. Sendo assim, os helmintos acabam modulando a supressão da resposta imune do tipo 1, responsável pela atividade inflamatória, a principal resposta em casos de infecções virais.⁽¹⁶⁾

Doenças como *Diabetes mellitus* do tipo 2, bem como a obesidade e a síndrome metabólica estão amplamente relacionadas aos processos inflamatórios do sistema imunológico do paciente, o que torna tais indivíduos mais susceptíveis às formas mais graves da COVID-19, haja vista que se trata de uma doença capaz de ativar uma liberação intensa de citocinas pró-inflamatórias, culminando em uma falência sistêmica.⁽⁹⁾ Hays e sua equipe acreditam que a coinfeção helmíntica seja uma alternativa para evitar formas mais severas da COVID-19, dado o histórico destes parasitas quanto à modulação da resposta inflamatória. De acordo com os autores, tal resposta pode até mesmo ser capaz de modular a inflamação pulmonar causada pelo SARS-Cov-2.⁽¹⁷⁾

Ssebambulidde e sua equipe (2020) também afirmam que a presença de parasitas pode favorecer a modulação do sistema imunológico do paciente para combater a COVID-19. De acordo com os autores, estudos mostram uma redução no número de casos de infecções causadas pelo SARS-Cov-2 em regiões assoladas por parasitoses como malária, esquistossomose e diversas helmintíases oriundas do solo. Essa resposta imunomoduladora tem sido utilizada para embasar a lentidão do crescimento da curva da COVID-19 na África em 2020, haja vista que se trata de uma região assolada por parasitoses.^(18,19)

O estudo realizado por Gebrechkerkos e colaboradores, em fevereiro de 2021, corrobora com tal afirmação, uma vez que a pesquisa recente mostra que a COVID-19 se mostrou mais severa em casos de pacientes que não apresentavam uma coinfeção parasitária. Os resultados obtidos por esses autores demonstram que, possivelmente, os parasitas intestinais avaliados, helmintos e protozoários, sejam responsáveis por modular a resposta imune do paciente, reduzindo a hiperinflamação causada pela virose em questão. Além disso, os autores também afirmam que

pacientes com comorbidade que possuíam infecções parasitárias concomitantes apresentaram menor probabilidade de desenvolver a forma severa da COVID-19.⁽²⁰⁾

De acordo com os dados destacados no levantamento clínico da equipe de Wolday, dos 751 pacientes infectados com o vírus SARS-Cov-2, cerca de 37,8% apresentavam infecções parasitárias simultâneas. Tais indivíduos que possuíam coinfeções de parasitas como *Entamoeba* spp., *Hymenolopsis nana* e *Schistosoma mansoni* apresentaram menores chances de desenvolver a versão mais grave da COVID-19, onde apenas 10,6% evoluíram para a forma severa da virose em questão. Ao longo do estudo, os autores relataram 11 mortes, sendo todas do grupo de pacientes que não apresentaram a coinfeção.⁽²¹⁾

Em contrapartida, Bradbury e sua equipe reforçam a ideia de que infecções causadas por helmintos podem ativar as respostas do tipo 1 e 2, o que pode acarretar a redução da resistência imunológica dos pacientes ao SARS-Cov-2 e, consequentemente, agravar o estado dos pacientes em casos de coinfeção. Os autores sugerem ainda que a comunidade científica deve investigar a possibilidade de tais parasitoses favorecerem a disseminação da COVID-19 em regiões endêmicas de helmintos.⁽²²⁾ Por outro lado, Rollot e colaboradores afirmaram que a coinfeção esquistossomótica interferiu positivamente em uma infecção respiratória por Herpes vírus, reduzindo a gravidade da doença a partir do aumento da ativação de linfócitos T_{CD8+}, específicos para o vírus, através da liberação de IL-4,⁽²³⁾ sugerindo uma ideia contrária ao estudo de Bradbury e colaboradores (2020) quanto à modulação dos helmintos em casos de infecções virais, como a COVID-19.

Não obstante, deve-se levar em consideração o fato de que a COVID-19 também pode causar sintomas semelhantes a algumas parasitoses de ciclo pulmonar, como é o caso dos helmintos transmitidos pelo solo. A pneumonia parasitária é decorrente da migração da larva, fazendo com que o indivíduo acometido apresente manifestações como tosse, febre, falta de ar e até mesmo a chamada síndrome de Löffler, oriunda da reação antigênica. Sendo assim, o risco de diagnósticos errados em casos de parasitoses em meio à pandemia é elevado, favorecendo o tratamento inadequado e o agravamento da situação do paciente.⁽²⁴⁾

Diferentes pesquisas afirmam que as coinfeções helmínticas são responsáveis por um aumento considerável na morbimortalidade de doenças graves, como AIDS, malária e tuberculose. Partindo desse pressuposto, Abdoli afirma que os helmintos também podem ser responsáveis por um agravamento na COVID-19. Além disso, segundo ele, a imunomodulação destes parasitas pode causar uma ineficácia das vacinas, principalmente em pacientes imunocomprometidos, ou seja, que apresentam idade avançada, comorbidades e/ou gestantes, prejudicando, assim,

a imunização da população.⁽²⁵⁾ Corroborando com essa proposta, Hartmann e sua equipe relataram a redução da eficácia da vacina contra H1N1, com presença concomitante ou prévia da infecção helmíntica, observando a redução da quantidade e da qualidade dos anticorpos produzidos por indução vacinal.⁽²⁶⁾

É válido ressaltar que, até o presente momento, por ser um assunto extremamente novo, alguns dos trabalhos citados estão na modalidade *preprint*, o que pode comprometer a fidedignidade de alguns dos resultados. Sendo assim, ainda que alguns autores sugiram a possibilidade da helmintíase experimental como uma alternativa para modulação imunológica, trata-se de uma ideia muito controversa e que exige maiores estudos, controlados e aprofundados, para avaliar sua viabilidade.

CONCLUSÃO

Apesar da importância do tema alvo deste trabalho, observa-se que a quantidade de artigos abordando essa associação COVID x Parasitoses ainda é bastante escassa. A imunomodulação é também um assunto intrincado e muitos estudos ainda devem ser realizados para embasar melhor todas as perguntas lançadas. Apesar de alguns artigos afirmarem que a coinfeção pode levar a um prognóstico positivo, outros, em contrapartida, indicam o inverso. Muitas variáveis existem e todas elas devem ser consideradas antes de qualquer julgamento ou decisão. É opinião das autoras que somente o investimento maciço em estudos nesse segmento pode elucidar a complexa relação entre o sistema imune, as parasitoses e a COVID-19.

Abstract

Until now, more than 550,000 deaths caused by COVID-19 have been reported in Brazil. Stimulated by Sars-Cov-2, the formation of an inflammasome causes a systemic inflammatory process, responsible for the progression of the disease, and favors the emergence of opportunistic diseases, such as parasitosis, which are excellent modulators of the immune system, inducing a tolerance of the organism through the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory responses. From this, a bibliographical survey was carried out with the aim of evaluating the possible immunomodulatory relationship of parasitic infections in COVID-19. There is an extensive discussion regarding the presence of parasitic diseases concomitant to this coronavirus, due to the possibility of modulation of the immune system, which may be able to curb or intensify the progression of COVID-19, as well as interfere with the post-vaccine seroconversion of affected individuals, a since diseases directly related to inflammatory processes, such as type 2 diabetes mellitus, make these individuals more susceptible to the more severe forms of this pandemic. Thus, although some authors suggest the possibility of experimental helminthiasis as an alternative to immunomodulation. This is a controversial idea, which needs further studies to assess whether such a procedure would be safe and viable to apply or not.

Keywords

COVID-19; Immunomodulation; Opportunistic parasitosis

REFERÊNCIAS

1. Lima CMAO. Informações sobre o novo coronavírus (COVID-19). Radiologia Brasileira, Brasil, v. 53, n. 2, p. 1-1, abr./2020.
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: 23 mai. 2021.
3. Nogueira JMR, Silva LOP. Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v. 52, n.2, p. 117-121, 2020.
4. Duarte PM. COVID-19: Origem do novo coronavírus. Brazilian Journal of Health Review, v. 3, n. 2, p. 3585-3590, 2020.
5. Huang, Y. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. Acta Pharmacologica Sinica, v. 41, n. 9, p. 1141-1149, 2020.
6. OUR WORLD IN DATA. Statistics and Research: Coronavirus (COVID-19) Deaths, mai/2021. Disponível em: <https://ourworldindata.org/covid-deaths>. Acesso em: 24 mai 2021.
7. ESTADÃO. OMS afirma que o número de mortes por covid-19 no mundo é até 3 vezes maior que dados oficiais, mai/2021. Disponível em: <https://saude.estadao.com.br/noticias/geral,oms-estima-que-numero-de-mortes-por-covid-19-no-mundo-e-ate-3-vezes-maior-que-dados-oficiais,70003722094>. Acesso em: 24 mai 2021.
8. Rodrigues TS et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. Journal of Experimental Medicine, v. 218, n. 3, p. e20201707, 2020.
9. García LF. Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19. Frontiers in immunology, v. 11, p. 1441, 2020.
10. Huang C et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The Lancet, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.
11. Ruan Q et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. Intensive care medicine, v. 46, n. 5, p. 846-848, 2020.
12. Souza W. COVID-19 and parasitology. Parasitology Research, v. 119, p. 2369- 2370, 2020.
13. Broadhurst MJ et al. IL-22+ CD4+ T cells are associated with therapeutic trichuris trichiura infection in an ulcerative colitis patient. Science Translational Medicine, v. 2, n. 60, 2010.
14. Fleming, J. O. et al. Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study. Multiple Sclerosis Journal, v. 17, n. 6, p. 743- 754, 2011.
15. Benzel F et al. Immune monitoring of Trichuris suis egg therapy in multiple sclerosis patients. Journal of helminthology, v. 86, n. 3, p. 339-347, 2012.
16. Gazzinelli-Guimaraes PH, Nutman TB. Helminth parasites and immune regulation. F1000Research, v. 7, 2018.
17. Hays R et al. Helminth coinfection and COVID-19: An alternate hypothesis. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 14, n. 8, p. e0008628, 2020.
18. Ssebambulidde K et al. Parasites and their protection against COVID-19- Ecology or Immunology?. medRxiv, 2020.
19. CLIMATEMPO. Impacto brando do coronavírus na África intriga cientistas. 2020. Disponível em: <https://www.climatempo.com.br/noticia/2020/09/07/impacto-brando-do-coronavirus-na-africa-intriga-cientistas-5610>. Acesso em: 23 mai 2021.
20. Gebrecherkos, T. et al. Effect of co-infection with parasites on severity of COVID-19. medRxiv, 2021.
21. Wolday D et al. Effect of Co-Infection with Intestinal Parasites on COVID-19 Severity: A Prospective Observational Cohort Study. SSRN, 2021. Disponível em: <https://ssrn.com/abstract=3832647> ou <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3832647>.
22. Bradbury RS et al. Will helminth co-infection modulate COVID-19 severity in endemic regions?. Nature Reviews Immunology, v. 20, n. 6, p. 342-342, 2020.
23. Rolot M et al. Helminth-induced IL-4 expands bystander memory CD8+ T cells for early control of viral infection. Nature communications, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2018.
24. Gluchowska K et al. The New Status of Parasitic Diseases in the COVID-19 Pandemic-Risk Factors or Protective Agents? Journal of Clinical Medicine, v. 10
25. Abdoli A. Helminths and COVID-19 Co-Infections: A Neglected Critical Challenge. ACS Pharmacology & Translational Science, v. 3, n. 5, p. 1039-1041, 2020.
26. Hartmann W et al. Helminth infections suppress the efficacy of vaccination against seasonal influenza. Cell reports, v. 29, n. 8, p. 2243-2256. e4, 2019.

Correspondência

Joseli Maria da Rocha Nogueira

Laboratório de Microbiologia

Departamento e Ciências Biológicas

Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Manguinhos

Rio de Janeiro-RJ, Brasil

E-mail: joselimaria@gmail.com

Avaliação fármaco-toxicológica do emprego de N-acetilcisteína no manejo da COVID-19

Pharmacological and toxicological evaluation of the N-acetylcysteine in clinical management of COVID-19

Matheus Grilo de Oliveira Carvalho¹
 Virgínia Martins Carvalho²

Resumo

Introdução: Diversos alvos farmacológicos têm sido estudados com o objetivo de minimizar as consequências da infecção causada pelo vírus da COVID-19. A hiperinflamação pulmonar foi associada ao estresse oxidativo embasando a administração de antioxidantes, especialmente N-acetilcisteína, que vem sendo proposta como terapia de suporte e investigada em estudos clínicos. **Objetivo:** Realizar uma análise crítica do uso da N-acetilcisteína em pacientes com COVID-19 com base em suas propriedades fármaco-toxicológicas. **Material e métodos:** Análise crítica a partir de revisão bibliográfica de artigos originais e de revisão de dados epidemiológico, clínicos e estudos de caso. Os dados farmacológicos e toxicológicos foram comparados para avaliar potenciais riscos e benefícios da adoção desta terapia. **Resultado:** A fisiopatologia da COVID-19 está associada à hiperinflamação causada pela liberação de citocinas e quimiocinas, denominada *tempestade de citocinas* que agrava a infecção respiratória, podendo levar ao quadro de Síndrome de Angústia Respiratória Aguda (SARA). Esse conjunto de fatores pode ser responsável pelo aumento do estresse oxidativo que está relacionado com a gravidade da infecção. A N-acetilcisteína parece atenuar o quadro inflamatório pela atividade antioxidante e anti-inflamatória e apresenta baixa toxicidade, sendo bem tolerada em doses de até 500 mg/kg. **Conclusão:** A N-acetilcisteína possui potencial no tratamento de pacientes com COVID-19 em estágios iniciais da doença para diminuir o estresse oxidativo.

Palavras-chave

COVID-19; estresse oxidativo; antioxidantes; N-acetilcisteína

INTRODUÇÃO

A doença COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, é responsável pelo terceiro surto por coronavírus deste século e o sétimo a infectar seres humanos.⁽¹⁾ SARS-CoV-2 é um vírus zoonótico. O contato inicial entre humanos e o vírus em um mercado de frutos do mar em Wuhan, na China, com a ingestão de morcegos contaminados constitui uma das hipóteses da origem da SARS-Cov-2.⁽¹⁾ A partir desse contágio inicial, o vírus teria começado a se propagar pelo contato entre humanos, a partir de gotículas ou por via fecal.⁽¹⁾ Por mais que a SARS-CoV-2 seja menos letal do que os surtos anteriores, a taxa de transmissão é maior

e pode explicar o porquê da COVID-19 ter causado uma pandemia com elevada taxa de transmissão em comparação aos demais surtos.⁽¹⁾

Esforços globais foram adotados para o desenvolvimento de vacinas e terapias farmacológicas capazes, respectivamente, de prevenir e tratar efetivamente a COVID-19. Diferentes abordagens terapêuticas estão sendo avaliadas, como o uso de anti-inflamatórios, antivirais, anticoagulantes, imunomoduladores e antioxidantes.

Dentre os alvos farmacológicos, o estresse oxidativo é relevante na fisiopatologia da infecção e pode ser um alvo promissor. Essa hipótese é sustentada por alguns estudos que apontam o estresse oxidativo como um dos fatores que

¹ Bacharel em Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² Bacharel em Farmácia, Mestre e Doutora em Toxicologia, Professor Adjunto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100960

levam ao agravamento do paciente infectado, com base em dados epidemiológicos e de surtos anteriores.⁽²⁻⁴⁾ Desta forma, o uso de antioxidantes como terapia de suporte é justificado e deve ser avaliado.

Entre os antioxidantes utilizados na clínica, a N-acetilcisteína (NAC) é um fármaco com propriedades terapêuticas conhecidas em infecções respiratórias, inclusive na síndrome respiratória aguda grave (SARA).⁽⁵⁾ Sua atividade antioxidante, especialmente como precursor de glutatona, e anti-inflamatória pode ser explorada no tratamento da COVID-19. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise crítica, à luz das publicações científicas, sobre o uso da NAC como terapia de suporte em pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2.

MATERIAL E MÉTODOS

A análise crítica foi realizada por revisão bibliográfica através de levantamento de artigos originais e de revisão de dados epidemiológicos, estudos clínicos e estudo de casos. As bases utilizadas no levantamento bibliográfico foram PubMed, Scielo, EBSCO e Elsevier. Os estudos clínicos foram levantados no site clinicaltrials.gov; os dados epidemiológicos foram extraídos de órgãos oficiais de saúde, como a Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde.

Os descritores adotados foram: "COVID19", "SARS-COV 2", "ARDS", "ACE2", "antioxidants", "antioxidants therapy", "n-acetylcysteine", "glutathione" e "oxidative stress". Para aperfeiçoar o mecanismo de busca, foram utilizados os operadores booleanos "and", "or" e "not". Os estudos foram avaliados a partir da leitura dos resumos e os que se encaixaram dentro da temática do estudo foram incluídos na revisão. Além disso, foi aplicado um filtro temporal entre 2003 e 2021 dos estudos selecionados para a revisão bibliográfica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estresse oxidativo e a COVID-19

Correlação entre o estresse oxidativo e o agravamento da COVID-19 foi sugerida em casos de SARA causada por outras coronavíruses, com base na avaliação de manifestações clínicas e mecanismos fisiopatológicos.

O estresse oxidativo é uma condição patológica definida como um desequilíbrio das concentrações endógenas de fatores pró-oxidantes em relação a antioxidantes.⁽⁶⁾ Os radicais livres constituem os fatores pró-oxidantes e são compostos principalmente por espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que contribuem em lesões celulares, desequilíbrio metabólico e na liberação de marcadores pró-inflamatórios.⁽²⁾ As moléculas reativas em condições de homeostase atuam no metabolismo transportando elétrons em reações bioquímicas

participam de mecanismos de defesa celular em processos inflamatórios, na ativação de genes e fertilização de óvulos.

Se o aumento de espécies reativas contribui para o agravamento da COVID-19, o uso de antioxidantes poderia atenuar o quadro de lesão celular ocasionado pelo estresse oxidativo, melhorando o desfecho clínico. Os dois principais danos estudados são os macromoleculares teciduais e o da interrupção dos circuitos tiol redox executado especialmente pela glutatona.⁽²⁾

Achados laboratoriais em pacientes com COVID-19 justificam a investigação do papel do estresse oxidativo neste quadro inflamatório. Alguns marcadores, como a ferritina, glutatona (GSH) e ácido úrico apresentam-se alterados em pacientes infectados. Polonikov⁽³⁾ relatou uma deficiência de GSH em pacientes com COVID-19 e encontrou uma correlação entre essa deficiência e o agravamento da infecção, embora sua casuística seja de apenas quatro pacientes. O esgotamento de GSH afeta o potencial antioxidante celular, levando à maior concentração de EROs, que por sua vez estimula a produção de fatores pró-inflamatórios, como NF- κ B e TNF- α .⁽⁴⁾ A hiperferritina observada em pacientes com COVID-19 está associada ao aumento da mortalidade.⁽⁷⁾ A ferritina é uma proteína globular que armazena ferro e é utilizada como marcador em processos inflamatórios e no processo de regulação do ferro. O aumento de ferritina ocorre concomitante ao aumento da hepcidina, um importante hormônio que induz o armazenamento de ferro devido a sua sobrecarga ou a estímulos de outros hormônios e citocinas.⁽⁸⁾ Desta forma, é possível que esses dois marcadores possam sinalizar uma sobrecarga de ferro em especial no local da inflamação, que pode estar relacionada com o aumento do estresse oxidativo, a partir da reação de Fenton.

Outro marcador clínico observado em pacientes com COVID-19 foi a diminuição da dosagem de ácido úrico, sendo referida correlação entre o decréscimo de ácido úrico e aumento da gravidade da doença.⁽⁹⁾ Na clínica, a avaliação da dosagem de ácido úrico é utilizada principalmente como marcador do metabolismo de purinas e de inflamação. O ácido úrico possui grande participação na defesa antioxidante, neutralizando por volta de 60% das EROs presentes no plasma.⁽¹⁰⁾

Avaliando os aspectos epidemiológicos da COVID-19, observa-se que pacientes idosos, portadores de doenças crônicas como hipertensão, diabetes e asma e fumantes são mais suscetíveis a ter insuficiência respiratória e, assim, um pior prognóstico em comparação aos demais grupos populacionais.⁽¹⁾ Este grupo de pacientes também está relacionado por possuir condições clínicas favoráveis ao aumento do estresse oxidativo,⁽³⁾ em geral são pacientes que apresentam resposta antioxidante menos competente e um aumento de EROs e ERNs devido aos processos fisiopatológicos de suas morbidades. Desequilíbrio redox foi observado em

ensaios em modelo animal, em que ratos idosos infectados com a SARS-CoV-1 apresentaram lesões pulmonares mais graves em comparação com ratos jovens, sendo sugerido que o sistema de defesa antioxidante enfraquecido devido à senescência com aumento de EROs estaria relacionado à gravidade.⁽²⁾ Assim, um quadro clínico mais vulnerável a variações de EROs, especialmente em idosos, pode contribuir para a suscetibilidade do agravamento da infecção, justificando a inserção desse grupo de pacientes em grupo de risco para a COVID-19.

Diferentes mecanismos de geração de radicais livres foram propostos para o SARS-CoV-2a partir da fisiopatologia da COVID-19 e de comparações por infecções por outros coronavírus, em especial o SARS-CoV-1. Alguns desses mecanismos envolvem a ativação da NADPH oxidase (Nox) via receptor da enzima conversora de angiotensina-2 acoplado à proteína G tipo 1 (AT1), a geração e liberação de EROs via NSP5 e a degranulação de neutrófilos (netose), abordados neste trabalho.

Ativação da NADPH Oxidase (Nox) via receptor AT1R

A ativação Nox é a principal via de formação de EROs, incluindo ânion radical de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).⁽⁴⁾ Em estudo, Violi et al. mostraram que pacientes com COVID-19 apresentaram níveis elevados de Nox2 em relação ao controle, sendo que os níveis foram maiores em pacientes graves em comparação com pacientes com quadro leve a moderado,⁽¹¹⁾ sugerindo que a via da Nox estaria envolvida no aumento do estresse oxidativo durante a infecção por SARS-Cov-2. Além de aumentar os níveis de EROs, essa via ativa o NF-κB responsável pela síntese de diversas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, estando presente, por exemplo, na formação do inflamassoma NLRP3, levando à piroptose de células infectadas.

A enzima conversora de angiotensina-2 (ECA-2) possui uma função contrarregulatória no sistema renina-angiotensina-aldosterona, promovendo vasodilatação, atividade anti-inflamatória, antiproliferativa e cardioprotetora.⁽¹²⁾ A infecção por SARS-Cov-2 ocasiona um feedback negativo de ECA-2, aumentando a biodisponibilidade da angiotensina-2, uma vez que os receptores de ECA-2 estarão reduzidos e mais moléculas de angiotensina 2 estarão livres,⁽⁴⁾ AT1R é ativado resultando em desequilíbrio redox a partir da ativação da Nox.⁽¹³⁾ A ligação da angiotensina-2 em AT1R resulta na ativação de Nox 1 e 2 via proteína quinase C (PKC) e c-src (uma proto-oncogene cinase) e na ativação de Nox 5 pela liberação de cálcio intracelular.⁽¹³⁾ As Nox resultarão na produção de ERO via mitocondrial.

Geração de EROs pela 3CLpro (NSP5)

Lin et al.⁽¹⁴⁾ avaliaram em estudo *in vitro* o papel da 3C-like protease (3CLpro), que é uma das proteases do

tipo CoV nsp5 (NSP5) na ativação da via apoptótica na SARS-CoV-1, e demonstraram seu papel na ativação de caspases e aumento de EROs e NF-κB. A 3CLpro aumentou as concentrações de EROs e NF-κB em relação ao controle. É provável que o mesmo ocorra na SARS-CoV-2, uma vez que a NSP5 possui 97,5% de similaridade.⁽¹⁵⁾

Degranulação extracelular de espécies reativas

A degranulação extracelular por neutrófilos ocorre durante o processo inflamatório pulmonar pela COVID-19. É um mecanismo de destruição de patógenos alternativo à fagocitose, sendo, a princípio, benéfico ao organismo.⁽⁴⁾ Entretanto, um descontrole desta via leva a uma liberação exacerbada de proteínas microbicidas e enzimas oxidantes.⁽⁴⁾ Schönrich, Raftery e Samstag⁽¹⁶⁾ sugerem que o aumento do estresse oxidativo em pacientes com COVID-19 leva a um aumento da netose, que por sua vez eleva a produção de EROs e suprime os mecanismos de imunidade adaptativa por linfócitos T, gerando um ciclo vicioso e levando à gravidade do paciente infectado.

Análise crítica da aplicação terapêutica da N-acetilcisteína no manejo da COVID-19

O emprego de antioxidantes mostrou resultados favoráveis no manejo de doenças respiratórias, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), pneumonias, SARA e sepse pulmonar.^(5,17) Há diversos tipos de terapias antioxidantes com medicamentos como a N-acetilcisteína e suplementos alimentares, como vitaminas C, D, E, e micronutrientes como o magnésio e o zinco que têm por objetivo melhorar o estado clínico do paciente, restabelecer o equilíbrio antioxidante ou atuar no mecanismo fisiopatológico.

NAC é um fármaco sintetizado a partir do aminoácido cisteína, que possui ação mucolítica, antioxidante, antídota e anti-inflamatória.⁽¹⁸⁾ Por doar cisteína, atua como precursora de GSH, que compõe o sistema antioxidante endógeno. As indicações farmacológicas são: antídoto em pacientes intoxicados por paracetamol e mucolítico em doenças pulmonares como DPOC, fibrose pulmonar e infecções respiratórias pulmonares.⁽¹⁸⁾ A posologia depende da indicação clínica, variando de 150mg/kg empregado no tratamento antidotal na intoxicação por paracetamol a 200 mg/dia como mucolítico. Em relação às propriedades farmacocinéticas, a NAC apresenta tempo de meia-vida biológica de 5 a 6 horas em adultos, baixa biodisponibilidade, entre 6% a 10% por administração oral, e volume de distribuição de 0,5 L/kg.⁽¹⁸⁾

Em relação ao perfil toxicológico, a NAC apresenta segurança em doses de até 500 mg/kg.⁽¹⁸⁾ Em estudos experimentais, os níveis de doses letais foram 1000 mg/kg em camundongos, 2445 mg/kg em ratos, 1500 mg/kg em porquinhos da Índia, 1200 mg/kg em coelhos e 500 mg/kg em cães.⁽¹⁸⁾ Não existem dados sobre letalidade em seres humanos, porém a dose letal humana foi estimada entre 5 e

15 g/kg; considerando a menor dose estimada, a dose letal para indivíduo de 70 kg seria de 350 g. Os sinais e sintomas da intoxicação aguda são ataxia, hipoatividade, dificuldade respiratória, cianose, perda de reflexo e convulsões. Apesar do perfil de segurança elevado, a NAC pode apresentar eventos adversos, como broncoespasmo em pacientes asmáticos e irritação gástrica que pode agravar quadros de úlcera péptica.⁽¹⁸⁾

A possível atuação da NAC na infecção por SARS-CoV-2 tem base em mecanismos diretos e indiretos, tais como ação antioxidante, anti-inflamatória e mucolítica (Figura 1).

A ação antioxidante da NAC ocorre tanto direta quanto indiretamente, neste caso doando o substrato cisteína para a síntese de GSH endógena. Apesar de a NAC possuir baixa reatividade aos principais EROs, como H_2O_2 , $O^{\cdot-}$ e $HO^{\cdot}$,⁽¹⁹⁾ apresenta alta reatividade ao ácido hipocloroso e espécies relacionadas, que são liberadas em processos inflamatórios por neutrófilos e macrófagos. O restabelecimento dos níveis

de GSH em pacientes com COVID-19 permite o equilíbrio da defesa antioxidante e ação contra os principais mecanismos radiculares, neutralizando EROs como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($HO^{\cdot}$).⁽¹⁹⁾ O esgotamento de GSH foi associado ao agravamento do quadro clínico de pacientes infectados pela COVID-19, assim a recuperação de GSH endógena é fundamental e pode ser considerada a principal via de atuação da NAC no manejo da COVID-19.⁽³⁾

Outro mecanismo indireto de ação antioxidante da NAC na COVID-19 é pela ação nos receptores ECA. O mecanismo de geração de EROs via receptor AT1 e da ativação da Nox ocorre de forma exacerbada na SARS-CoV-2 devido à ligação do vírus ao receptor ECA-2, que atua como contrarregulador desta via. Estudo *in vitro* demonstrou a capacidade da NAC de bloquear o receptor ECA-1, diminuindo as concentrações de angiotensina-2 e o estresse oxidativo celular.⁽²⁰⁾ O bloqueio dessa via pode atenuar a liberação de EROs, devido a inativação da Nox pela via da ECA-2.

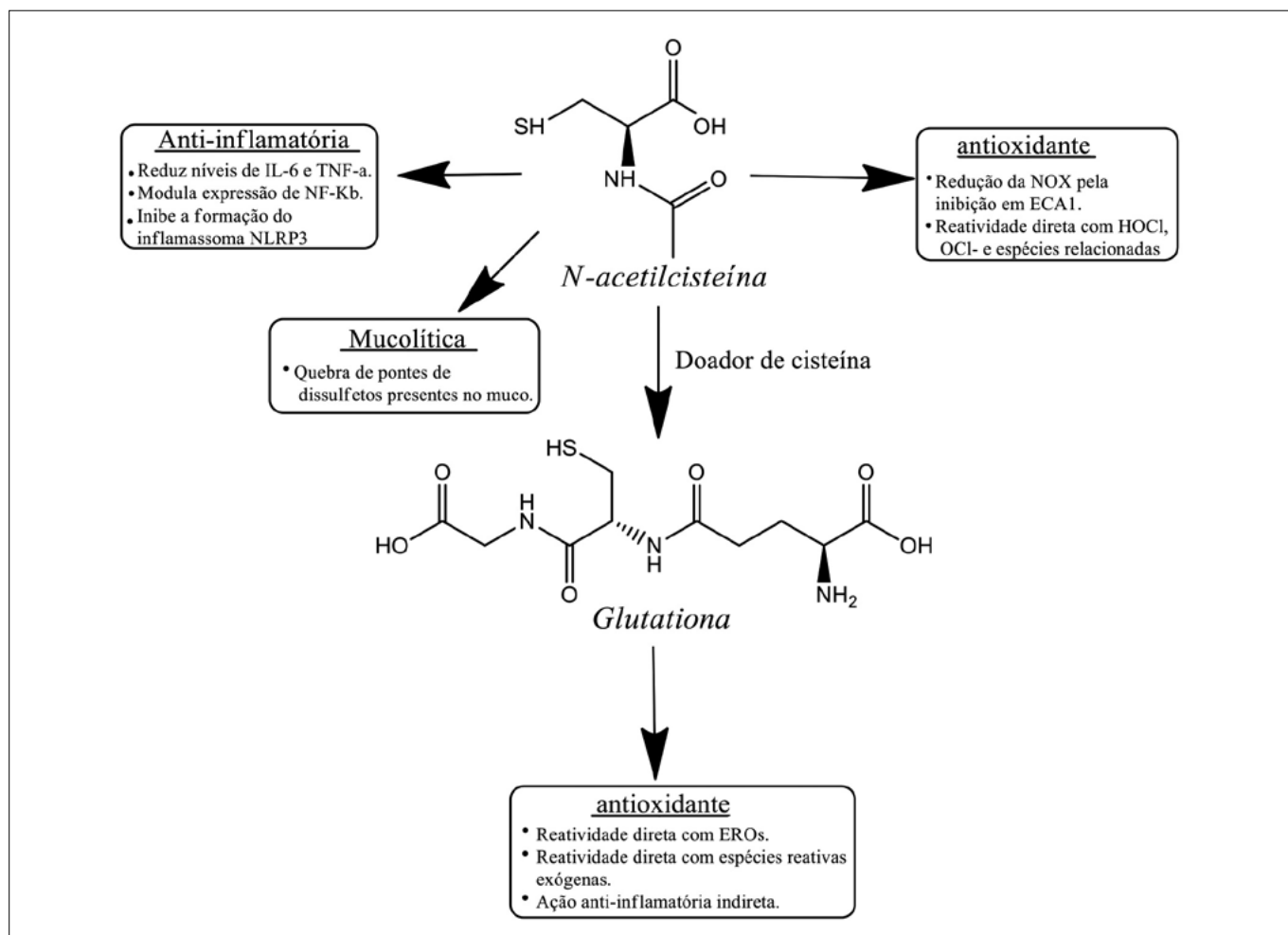


Figura 1. Atividade farmacológica da N-acetilcisteína

A atividade anti-inflamatória da NAC é devida, em parte, pelas propriedades da recuperação dos níveis de GSH. Estudos demonstram que a NAC diminui importantes marcadores inflamatórios, que estão presentes na COVID-19, como o NF- κ B, TNF- α e a IL-6.^(5,21) Além disso, a NAC diminui citocinas relacionadas à formação do inflamassoma NLRP3, como a IL-1 β , IL-18, além do próprio NF- κ B, que participam da via da piroptose e está relacionada com a fisiopatologia da COVID-19.⁽²²⁾ Essas citocinas são responsáveis pela produção de outras citocinas pró-inflamatórias e estão relacionadas com a resposta exacerbada, levando ao quadro de tempestade de citocinas. Assim, a NAC pode minimizar o quadro hiperinflamatório em estágios iniciais da COVID-19 antes que ocorra injúria do tecido pulmonar. Ainda, a inibição de NF- κ B pela NAC tem sido associada a uma diminuição da replicação viral por vírus de RNA, como os Coronavírus.⁽²³⁾

Em relação ao efeito mucolítico da NAC, ele é baseado na presença de um grupo sulfidril livre(-SH) que abre as ligações dissulfeto(S-S) das glicoproteínas do muco, reduzindo a sua viscosidade e elasticidade.⁽²⁴⁾ Liu *et al.*⁽²⁵⁾ relata a produção de muco pela ativação da via IDO-Kyn como um dos fatores que levam ao quadro de hipóxia na COVID-19. A ação de um mucolítico como a NAC pode melhorar a fluidez pulmonar e contribuir para a melhora clínica da hipóxia.

A NAC demonstra um potencial farmacológico na COVID-19, com mecanismos que poderiam atenuar o quadro hiperinflamatório e minimizar a tempestade de citocinas, além de outros ganhos terapêuticos. Entretanto, é necessário cautela para não hiperestimar sua relevância na prática clínica. A meta-análise realizada por Galvão *et al.*⁽²⁶⁾ demonstrou resultados conflitantes para o uso da NAC no quadro de lesão pulmonar aguda e na SARA, embora parte dos estudos avaliados tenham demonstrado melhora no estresse oxidativo e nos níveis de oxigenação. Especificamente na COVID-19, um estudo clínico realizado no Hospital das Clínicas, São Paulo, Brasil, avaliou o uso da NAC intravenosa em pacientes graves e constatou que a NAC foi ineficaz em reduzir a mortalidade e a necessidade de ventilação mecânica,⁽²⁷⁾ embora tal estudo tenha sido realizado apenas com pacientes graves, já hospitalizados.

Em relação ao esquema terapêutico, é importante considerar que o lapso temporal entre o agravamento do quadro clínico e início do tratamento farmacológico pode representar fator determinante no prognóstico clínico. O uso da NAC no tratamento de pacientes intoxicados por paracetamol é um exemplo. Em doses tóxicas o paracetamol forma o metabólito altamente reativo N-acetil-p-benzo-quinonaimina (NAPQI) responsável pela necrose hepática por promover peroxidação lipídica nos hepatócitos. Neste quadro, a administração da NAC possui o objetivo de fornecer cisteína ao

tecido hepático para a síntese de GSH, que irá diminuir, por sua vez, o dano celular causado pelo aumento do estresse oxidativo promovido pela NAPQI. A administração da NAC após dez horas da intoxicação, entretanto, começa a demonstrar uma diminuição de eficácia terapêutica.⁽²⁸⁾ Isso ocorre porque o dano celular causado pelo estresse oxidativo já é extenso, e o uso da NAC não permite regenerar tecido já lesionado, mas evitar o processo que leva à necrose hepática. Essa lógica se aplica aos pacientes infectados por SARS-CoV-2. À medida que o quadro de hiperinflamação e dano celular avança, o potencial de prevenção ao estresse oxidativo da NAC diminui.

O objetivo terapêutico primário para a NAC é o restabelecimento da defesa antioxidante frente à COVID-19, a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como o NF- κ B, TNF- α e IL-6, e um desfecho clínico mais favorável, evitando o agravamento da infecção em pacientes com o quadro leve a moderado, quadro este que poderia ser afetado pela equipe de saúde. A determinação do momento certo para o início da terapia é fundamental, visto que a administração deve ocorrer antes do dano celular extenso devido ao aumento do estresse oxidativo. A transição entre o quadro moderado para forma grave seria tardia para o início do tratamento com a NAC. Isso porque, apesar da NAC apresentar pico plasmático em menos de duas horas, a glutatona demora quatro dias para chegar em seu pico em pacientes portadores de SARA.⁽²⁹⁾

Atualmente há sete estudos clínicos registrados no clinicaltrials.gov que pesquisam a adoção de NAC no manejo da COVID-19 (Quadro 1). De forma geral, os estudos utilizam doses elevadas de NAC, acima de 1200 mg/dia, em diferentes grupos populacionais. Dose de 1200 mg/dia foi suficiente para diminuir os níveis de TNF- α e IL-6 e elevar os níveis de GSH em estudos clínicos sugerindo o potencial terapêutico no tratamento de pacientes com quadro leve a moderado.^(5,24) Em relação ao tempo de administração, os estudos clínicos trabalham com faixa de uma a três semanas de tratamento, sendo tal faixa relativa ao quadro clínico do paciente que deverá ser avaliada individualmente.

O uso de GSH injetável possibilita a disponibilidade imediata do antioxidante independentemente da biossíntese celular,⁽³⁰⁾ sugerindo aplicação mais adequada em quadros moderado a grave em ambiente hospitalar que requer resultados clínicos mais imediatos. Por outro lado, a administração de NAC que apresenta latência de quatro dias para atingir o pico plasmático de GSH seria de maior aplicação em quadros leves a moderados, oferecendo, além da ação antioxidante, atividade anti-inflamatória e mucolítica. A disponibilidade de várias formulações de NAC no mercado, como comprimido, pó, xarope e injetável, facilita o planejamento da terapia.

Quadro 1 - Estudos clínicos sobre manejo de COVID-19 com N-acetilcisteína.

Nome do Estudo	Identificação	Tipo de Estudo	Numero de Participantes	Medicamentos Avaliados	Dose da n-acetilcisteína	Via de administração
A Study of N-acetylcysteine in Patients With COVID-19 Infection	NCT04374461	Paralelo, Não randomizado	84	n-acetilcisteína	6 g/dia	injetável
Trial of Famotidine & N-Acetyl Cysteine for Outpatients With COVID-19	NCT04545008	Paralelo, Randomizado	42	n-acetilcisteína; Famotidina	1,8 g/dia; 3,6 g/dia; 5,4 g/dia	Oral
Efficacy of N-Acetylcysteine (NAC) in Preventing COVID-19 From Progressing to Severe Disease	NCT04419025	Paralelo, Randomizado	200	n-acetilcisteína	Internados: Dose inicial de 25 mg/kg após 1,2 g/dia; Ambulatorial: Dose inicial 2,4 g/dia após 1,2 g/dia	Oral
Inflammatory Regulation Effect of NAC on COVID-19 Treatment (INFECT-19)	NCT04455243	Paralelo, Randomizado	1180	n-acetilcisteína	300 mg/kg/dia	oral ou injetável
Glutathione, Oxidative Stress and Mitochondrial Function in COVID-19	NCT04703036	Paralelo, randomizado	64	n-acetilcisteína, glicina e alanina	Suplementação na dieta	Oral
Clinical Application of Methylene Blue for Treatment of Covid-19 Patients (Covid-19)	NCT04370288	Paralelo, randomizado	20	MCN (azul metileno, vitamina C e n-acetilcisteína)	Não determinada	injetável
Antioxidants as Adjuvant Therapy to Standard Therapy in Patients With COVID-19 (ANTIOX-COVID)	NCT04570254	Paralelo, não randomizado	11	n-acetilcisteína, vitamina C, vitamina E, Melatonina, pentoxifilina	1,2 g/dia	oral

CONCLUSÃO

A literatura científica mostra associação entre o estresse oxidativo e o agravamento da COVID-19 sugerindo o potencial de antioxidantes no manejo da doença. Dentre os antioxidantes disponíveis, a NAC se destaca pelo uso consagrado como antioxidante, mucolítico e antídoto para intoxicação por paracetamol. A NAC possui estudos de segurança e eficácia para as indicações arroladas por diferentes vias de administração e tem disponibilidade no mercado de várias formulações. O uso da NAC poder ser recomendado como uma terapia de suporte na COVID-19. Seu uso individual não levará em si ao processo de cura da infecção, mas poderá atenuar alguns aspectos fisiopatológicos, como a hiperinflamação e o estresse oxidativo.

Outros antioxidantes com potencial de uso são melatonina, que também possui ação anti-inflamatória, vitamina C que vem sendo estudada no manejo da COVID-19 em 53 estudos clínicos registrados no clinicaltrials.gov, e outros suplementos tais como vitamina E e zinco.

Abstract

Introduction: Focusing the efforts to minimizing the injury caused by COVID-19 virus, many pharmacological targets have been studied. The lung hyper inflammation was referred as a consequence of the oxidative stress and supports the antioxidant therapy, especially the N-acetylcysteine administration that has been proposed in some clinical studies. **Aims:** In order to make a critical analysis of COVID-19 clinical management with N-acetylcysteine, the physiopathology of the infection was compared with the pharmacological and toxicological properties of the N-acetylcysteine. **Methodology:** A literature review was made and the peer-reviewed articles, epidemiologic data, clinical studies and case reports were consulted. The pharmacological and toxicological data were compared to evaluate the potential risks and benefits of the N-acetylcysteine therapy. **Results:** The COVID-19 physiopathology is based on the hyper inflammation that is a consequence of the cytokines storm (release of a large amount of pro-inflammatory cytokines and chemokines). The hyper inflammation can result in the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). The cytokines storm was associated with the oxidative stress and the severity of the infection. N-acetylcysteine seems to improve the inflammation by its antioxidant and anti inflammatory properties. Furthermore, N-acetylcysteine shows high tolerability in doses until 500 mg/kg. **Conclusion:** N-acetylcysteine shows high therapeutic potential to decrease the oxidative stress in early stages of the infection in COVID-19 patients.

Keywords

COVID-19; oxidative stress; antioxidants; N-acetylcysteine

REFERÊNCIAS

1. Dhama K, Khan S, Tiwari R, Sircar S, Bhat S, Malik YS, et al. Coronavirus Disease 2019–COVID-19. *Clin Microbiol Rev*. 2020 Jun;33(4).
2. Delgado-Roche L, Mesta F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. *Arch Med Res*. 2020 Jul;51(5) p. 384-7.
3. Polonikov A. Endogenous Deficiency of Glutathione as the Most Likely Cause of Serious Manifestations and Death in COVID-19 Patients. *ACS InfectDis*. 2020 Jul;6(7) p. 1558-62.
4. Beltrán-García J, Osca-Verdegal R, Pallardó FV, Ferreres J, Rodríguez M, Mulet S, et al. Oxidative Stress and Inflammation in COVID-19-Associated Sepsis: The Potential Role of Anti-Oxidant Therapy in Avoiding Disease Progression. *Antioxidants*. 2020 Sep;9(10) p. 936.
5. Zhang Q, Ju Y, Ma Y, Wang T. N-acetylcysteine improves oxidative stress and inflammatory response in patients with community acquired pneumonia. *Med (United States)*. 2018;97(45).
6. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas R de CG, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*. 2010 Aug;23(4) p. 629–43.
7. Cheng L, Li H, Li L, Liu C, Yan S, Chen H, et al. Ferritin in the coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J Clin Lab Anal*. 2020 Oct;34(10).
8. Zhou C, Chen Y, Ji Y, He X, Xue D. Increased Serum Levels of Hepcidin and Ferritin Are Associated with Severity of COVID-19. *Med Sci Monit*. 2020 Sep;26.
9. He B, Wang J, Wang Y, Zhao J, Huang J, Tian Y, et al. The Metabolic Changes and Immune Profiles in Patients With COVID-19. *Front Immunol*. 2020 Aug;11.
10. Fabbri E, Serafini M, Colic Baric I, Hazen SL, Klein S. Effect of Plasma Uric Acid on Antioxidant Capacity, Oxidative Stress, and Insulin Sensitivity in Obese Subjects. *Diabetes*. 2014 Mar;63(3) p. 976-81.
11. Violi F, Pastorì D, Cangemi R, Pignatelli P, Loffredo L. Hypercoagulation and Antithrombotic Treatment in Coronavirus 2019: A New Challenge. *ThrombHaemost*. 2020 Jun 29;120(06) p. 949–56. doi: 10.1055/s-0040-1710317
12. Nunes-Silva A, Rocha GC, Magalhaes DM, Vaz LN, Salviano de Faria MH, Simoes e Silva AC. Physical Exercise and ACE2-Angiotensin-(1-7)-Mas Receptor Axis of the Renin Angiotensin System. *Protein Pept Lett*. 2017 Nov;24(9).
13. Dikalov SI, Nazarewicz RR. Angiotensin II-Induced Production of Mitochondrial Reactive Oxygen Species: Potential Mechanisms and Relevance for Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Oct;19(10) p. 1085-94.
14. Lin C-W, Lin K-H, Hsieh T-H, Shiu S-Y, Li J-Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like protease-induced apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006 Apr;46(3) p. 375-80.
15. Yoshimoto FK. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J*. 2020 Jun;39(3) p. 198-216.
16. Schönrich G, Raftery MJ, Samstag Y. Devilishly radical NETWORK in COVID-19: Oxidative stress, neutrophil extracellular traps (NETs), and T cell suppression. *Adv Biol Regul*. 2020 Aug;77: 100741. doi: 10.1016/j.jbior.2020.100741.
17. Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ, Klotz P, Farver K, Ruzinski JT, et al. Randomized, Prospective Trial of Antioxidant Supplementation in Critically Ill Surgical Patients. *Ann Surg*. 2002 Dec;236(6) p. 814-22.
18. National Center for Biotechnology Information. Acetylcysteine. 2021.
19. Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res*. 2018 Jul;52(7) p. 751-62.
20. Ullian ME, Gelasco AK, Fitzgibbon WR, Beck CN, Morinelli TA. N-Acetylcysteine Decreases Angiotensin II Receptor Binding in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Aug;16(8) p. 2346-53.
21. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H Oxidase. *Circ Res*. 2000 Mar;86(5) p. 494-501.
22. Poe FL, Corn J. N-Acetylcysteine: A potential therapeutic agent for SARS-CoV-2. *Med Hypotheses*. 2020 Oct;143:109862.doi: 10.1016/j.mehy.2020.109862.
23. Shi Z, Puyo CA. N-Acetylcysteine to Combat COVID-19: An Evidence Review. *Ther Clin Risk Manag*. 2020 Nov;Volume 16 p. 1047–55.
24. Calzetta L, Matera MG, Rogliani P, Cazzola M. Multifaceted activity of N -acetyl- l -cysteine in chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Respir Med*. 2018 Aug;12(8) p. 693–708.
25. Liu F, Li L, Xu M, Wu J, Luo D, Zhu Y, et al. Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J Clin Virol*. 2020 Jun;127:104370.doi: 10.1016/j.jcv.2020.104370.
26. Galvão AM, Andrade AD de, Maia MB de S, Silva KER da, Bezerra A de A, Melo JF de, et al. Suplementação de antioxidantes no tratamento da lesão pulmonar aguda: meta-análise. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011 Mar;23(1) p. 41–8.
27. de Alencar JCG, Moreira C de L, Müller AD, Chaves CE, Fukuhara MA, da Silva EA, et al. Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial With N-acetylcysteine for Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Caused by Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020 Sep.
28. Park BK, Dear JW, Antoine DJ. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *BMJ Clin Evid*. 2015 Oct;2015.
29. Bernard GR. N-Acetylcysteine in experimental and clinical acute lung injury. *Am J Med*. 1991 Sep;91(3) p. S54–9.
30. Horowitz RI, Freeman PR, Bruzzese J. Efficacy of glutathione therapy in relieving dyspnea associated with COVID-19 pneumonia: A report of 2 cases. *Respir Med Case Reports*. 2020 Apr;30:101063. doi: 10.1016/j.rmcr.2020.101063.

Correspondência

Virgínia Martins Carvalho

Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Avenida Carlos Chagas Filho, 373, 2º andar, Bloco A, Sala 3, Cidade
Universitária - Ilha do Fundão - CEP 21941-902, Rio de Janeiro/RJ
Telefone: (21) 3938-6411 E-mail: vmcfarm@gmail.com

Uso da citometria de fluxo no diagnóstico sorológico da COVID-19

The use of flow cytometry for the serological diagnosis of COVID-19

Ingrid Fatima Zattoni¹

Geraldo Picheth^{1,2}

Fabiane Gomes de Moraes Rego^{1,2}

Mauren Isfer Anghebem^{2,3}

Vivian Rotuno Moure^{*1,2}

Glaucio Valdameri^{*1,2}

Resumo

A pandemia da COVID-19 tem tido um impacto devastador em todo o mundo e levou ao rápido desenvolvimento de testes diagnósticos. Diferentes tecnologias vêm sendo utilizadas para a detecção de imunoglobulinas frente à infecção por SARS-CoV-2. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA), quimioluminescentes e imunocromatográficos estão disponíveis e, no geral, apresentam poder diagnóstico limitado, principalmente para a detecção de IgA. A citometria de fluxo tem surgido como alternativa para o desenvolvimento de métodos sensíveis e específicos para a COVID-19 aplicados para diagnóstico, triagem e estratificação da doença. A citometria de fluxo é uma tecnologia óptica baseada em laser que detecta características físico-químicas de células ou partículas em um fluido heterogêneo. O artigo explora a citometria de fluxo para o diagnóstico da COVID-19 em duas estratégias para a detecção de anticorpos no soro ou plasma, uma utilizando antígenos virais expressos na superfície de células de mamíferos e outra com estes elementos imobilizados em microesferas (*beads*). A possibilidade de detecção rápida de múltiplos anticorpos simultaneamente, com pequeno volume de amostra e elevada sensibilidade e especificidade, torna a citometria de fluxo uma metodologia promissora para o laboratório clínico, como ferramenta de referência para auxiliar na contenção do processo pandêmico da COVID-19 e futuros eventos similares.

Palavras-chave

Citometria de fluxo; SARS-CoV-2; COVID-19; anticorpos IgG, IgM e IgA

INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma síndrome respiratória aguda, causada pelo SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave-Coronavírus 2) que se converteu em um processo pandêmico global, com os primeiros casos identificados no final de 2019. Após cerca de 20 meses, mais de 200 milhões de casos e 4 milhões de mortes por COVID-19 foram relatados no mundo. O Brasil registrou 10% do número de casos e 14% do número de óbitos.⁽¹⁾

A elevada taxa de transmissão e agressividade da COVID-19 aumentou a taxa de internação hospitalar de infectados, em particular nas Unidades de Terapia Intensivas (UTIs), que levaram ao colapso o Sistema de Saúde em muitos locais. Entre os processos para conter a expansão da COVID-19 a testagem em massa, identificando os infectados, é uma premissa essencial para o planejamento e as ações

da Infectologia. Neste contexto, o desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos, sensíveis e de baixo custo é essencial entre as ferramentas de combate ao processo pandêmico.⁽²⁾

As metodologias que utilizam a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real time reverse transcription polymerase chain reaction* - RT-qPCR), bem como testes sorológicos que detectam anticorpos e antígenos associados ao vírus, estão disponíveis ao laboratório.⁽²⁾

A RT-qPCR segue como padrão-ouro para diagnóstico de casos de infecção por SARS-CoV-2.⁽³⁾ A detecção de anticorpos é uma abordagem importante para o monitoramento da resposta imunológica e para acompanhamento da soroconversão, relevância mais acentuada, num contexto de vacinação em massa.

Os métodos de detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 devem ser aplicados durante o processo epidêmico

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

² Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

³ Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100968

do Coronavírus. Após cerca de uma semana desde as primeiras manifestações clínicas, a sensibilidade do diagnóstico molecular (RT-qPCR) diminui gradualmente para infecções por SARS-CoV-2, devido à redução da quantidade de partículas de vírus no trato respiratório. Nesses casos, os pacientes podem apresentar resultados falsos negativos, apesar da infecção em curso.⁽⁴⁾

CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DA INFECÇÃO POR SARS-COV-2

Estruturalmente, o vírus SARS-CoV-2 é formado pela proteína nucleocapsídeo ou nucleoproteína (N), proteína de membrana (M), proteína do envelope viral (E) e proteína Spike (S). A primeira é responsável pelo empacotamento de RNA viral formando uma estrutura helicoidal que se liga às proteínas de membrana. A proteína do envelope e a Spike interagem para formar o envelope viral, ligando-se às proteínas de membrana. A proteína S é a responsável pela entrada do vírus na célula do hospedeiro através da interação com um receptor celular, a enzima conversora de angiotensina-2 (ECA-2). Esta interação acontece através do domínio de ligação no domínio RBD (do inglês *receptor-binding domain*), que se encontra na subunidade S1.^(5,6)

A proteína S, mais especificamente o domínio RBD, é considerada o melhor alvo para terapias e anticorpos neutralizantes. A detecção de anticorpos neutralizantes anti-S pode ser utilizada como estratégia de triagem para o tratamento através de soro convalescente. A proteína N também é altamente imunogênica e comumente utilizada na identificação de anticorpos.⁽⁵⁾

A resposta imune clássica a patógenos virais envolve a produção de IgM no início do processo, frequentemente acompanhada pela emergência de IgA, e então seguida a produção de IgG.⁽⁷⁾ Na COVID-19, a evidência atual é conflitante, sendo descrito em algumas pesquisas que a IgM é produzida primeiro⁽⁸⁾ e, em outras, que as produções de IgM e IgG ocorrem simultaneamente, semelhante ao que foi observado em outras SARS associadas a outros coronavírus.⁽⁹⁾ O teste para a identificação da IgA associado à COVID-19 fornece uma alternativa clinicamente útil, pois estes anticorpos são secretados na superfície das mucosas e sua detecção e títulos no soro ou plasma podem refletir uma função imunológica das membranas mucosas.⁽¹⁰⁾ A soroconversão para IgM e IgG ocorre sete dias após infecção sintomática em 50% dos pacientes (14 dias em todos), mas não é seguida por declínio rápido na carga viral.⁽¹¹⁻¹³⁾ Em geral, se considera que a soroconversão acontece no período de 20 dias após início dos sintomas para IgG e IgM, com aumento persistente por três semanas com variações na ordem de aparecimento das imunoglobulinas.⁽³⁾ Também, estudos apontam que a IgA pode desempenhar uma função importante na proteção contra infecção por SARS-CoV-2,

uma vez que IgA está presente em mucosas, na sua forma dimérica e o trato respiratório superior é a principal porta de entrada para o vírus.⁽¹⁴⁾ O perfil do aparecimento de IgA é semelhante às outras imunoglobulinas.⁽⁸⁾ A determinação do perfil sorológico tem função relevante na epidemiologia da COVID-19 e na determinação do status imune dos pacientes assintomáticos.^(3,13)

Em relação à metodologia para testagem da COVID-19, inicialmente, diferentes métodos imunoenzimáticos e imunocromatográficos foram desenvolvidos, devido ao baixo custo e flexibilidade de adaptação dos testes para uso em ambientes com pouca infraestrutura.⁽¹⁵⁾ Entretanto, muitos destes testes apresentam limitações, como a dificuldade de aplicação em larga escala e resultados inconsistentes.⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

MÉTODOS DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS NA COVID-19

Os testes sorológicos para COVID-19 podem ser realizados através das várias metodologias comercialmente disponíveis, a citar: ensaios imunoenzimáticos (ELISA), imunoenaios fluoroenzimáticos, imunoenaios quimioluminescentes e imunocromatografia de fluxo lateral. Na essência, estes ensaios detectam duas classes de anticorpos, IgM e IgG. De uma forma geral, os testes sorológicos apresentam alta sensibilidade no período de três semanas após o início dos sintomas da doença.^(3,12) Com relação à especificidade dos testes, é considerada elevada para a detecção de IgM e IgG (maior ou igual a 95%). Entretanto, para a detecção de IgA a especificidade é inferior (84%, considerando o teste da EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA).⁽¹⁹⁾ Por isso, ainda existe necessidade do desenvolvimento de outras metodologias para o diagnóstico sorológico da COVID-19.

Entre os princípios metodológicos para identificação e monitoramento da COVID-19, a citometria de fluxo tem se mostrado como uma alternativa relevante.^(18,20-23)

A citometria de fluxo é uma técnica capaz de detectar múltiplos parâmetros em uma única célula ou em amostras biológicas como soro ou plasma. Devido à capacidade de analisar células individualizadas ou “beads” (micropartículas ligadas com elementos de interesse, no caso proteínas virais) e com marcações fluorescentes específicas, a citometria de fluxo sempre esteve muito relacionada ao uso de anticorpos conjugados a fluorocromos para pesquisa de marcadores celulares específicos. Por conta da flexibilidade e do uso consolidado de citômetros de fluxo para uso diagnóstico, é previsível e imperativo o desenvolvimento de metodologias baseadas em citometria de fluxo no diagnóstico imunológico da COVID-19.

As estratégias metodológicas baseadas em citometria de fluxo podem ser divididas em duas grandes categorias: sistemas baseados no uso de células e sistemas livre de células (Figura 1).

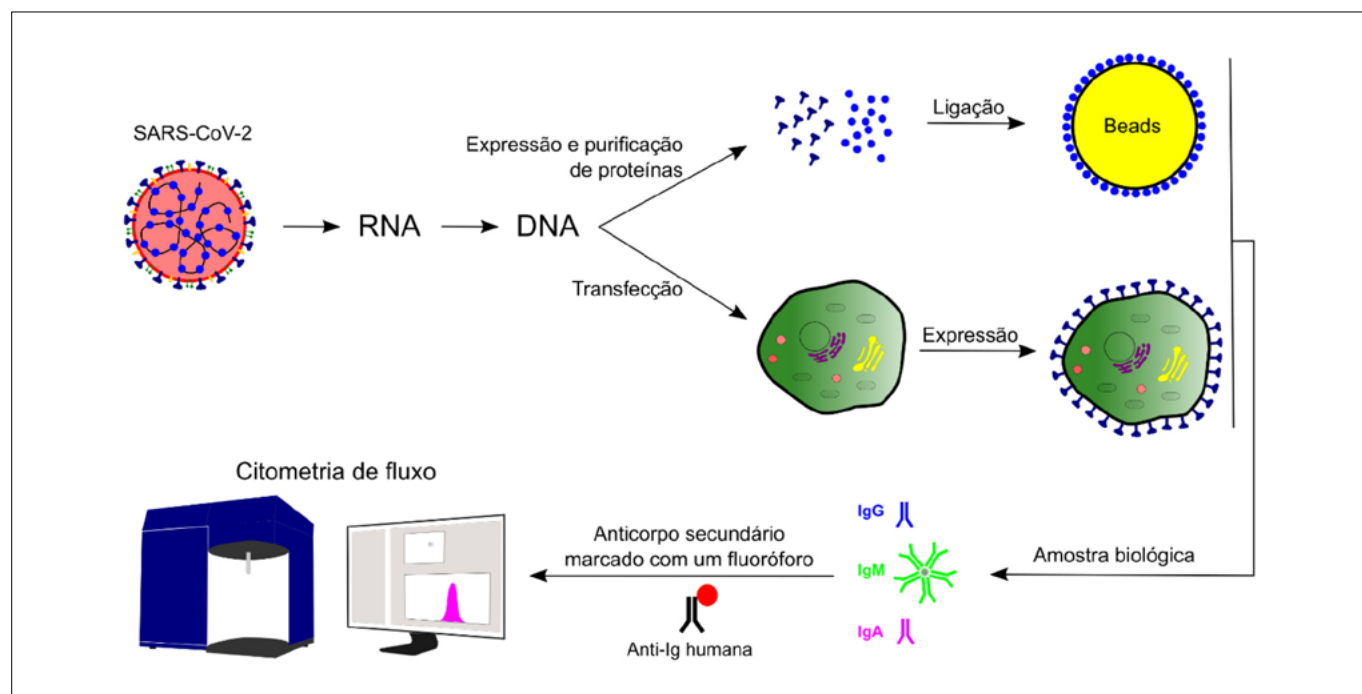


Figura 1. Representação das duas estratégias experimentais do uso da citometria de fluxo para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Em amarelo está representado beads (microesferas) recobertas com proteínas do vírus. Em verde está representada uma célula que foi transfectada para expressar em sua superfície as proteínas do vírus. Para ambas as estratégias são utilizadas amostras biológicas, como soro, para investigação de diferentes tipos de imunoglobulinas. A reação é revelada com anticorpos anti-imunoglobulinas humanas conjugadas com fluorocromos (fluoróforos) por citometria de fluxo.

Métodos baseados em células

Estes métodos foram desenvolvidos a partir da transfecção de células com vetores contendo o gene da proteína Spike, permitindo a expressão desta proteína na membrana plasmática das células eucarióticas. Uma das linhagens celulares utilizadas neste tipo de abordagem foram as células HEK293T. Estas células foram transfectadas com um plasmídeo contendo o gene que codifica para a proteína Spike. Assim, as células passaram a expressar a proteína Spike nativa na sua membrana plasmática, possibilitando o reconhecimento de imunoglobulinas no soro do paciente. Depois de incubar com o soro, uma segunda etapa de incubação com anticorpo secundário fluorescente foi realizada, possibilitando a detecção por citometria de fluxo.^(20,24) Células Jurkat também foram avaliadas como “suporte” para a expressão da proteína Spike. A grande vantagem neste caso é que estas células são cultivadas em suspensão, tornando o teste mais prático.^(22,23)

De maneira geral, os métodos baseados em citometria de fluxo usando células foram eficazes na detecção de imunoglobulinas no soro, sendo considerados superiores aos ensaios de ELISA, com alta sensibilidade/especificidade e diminuindo o limite de detecção.⁽¹⁸⁾ A expressão da proteína nativa permite a ligação de anticorpos que reconhecem diferentes epítomos na proteína Spike e não apenas a cadeia S1

ou o domínio RBD, como acontece em alguns kits comerciais.⁽²⁰⁾ Uma grande desvantagem desta estratégia é a necessidade de infraestrutura para cultivo celular, que pode não ser uma realidade para laboratórios clínicos em geral. Outro problema é a padronização e execução de procedimentos de transfecção transiente, que geralmente apresentam alta variabilidade na expressão de proteínas na membrana celular, impactando diretamente os resultados obtidos.

Métodos livres de células

Uma alternativa aos métodos baseados no uso de células é o uso de *beads* ou microesferas para imobilização de proteínas. As *beads* são esferas poliméricas com superfície quimicamente modificada que possibilita a conjugação de um anticorpo/antígeno. Elas funcionam como um suporte sólido para a captura do analito em uma matriz líquida.⁽²⁵⁾ Uma vez feita a conjugação, as *beads* são incubadas com a amostra biológica. O sistema é revelado através do uso de anticorpos conjugados com fluoróforos específicos para o analito, formando uma espécie de sanduíche. Quanto maior a ligação do anticorpo conjugado, maior a concentração do analito e maior o sinal emitido pelo equipamento.^(26,27) Outra forma de marcação é através do uso do complexo biotina-streptavidina, que proporciona um aumento na sensibilidade do ensaio. Neste caso, o analito capturado ou o

anticorpo secundário deve ser biotinizado, permitindo o uso da streptavidina conjugada com o fluoróforo.⁽²⁸⁾

As *beads* comercialmente disponíveis usualmente possuem fluorescência intrínseca e podem variar em tamanho e intensidade de fluorescência. Esta variabilidade de características possibilita a personalização do painel analítico permitindo uma análise multiparamétrica, conhecida como *multiplex*. É possível conjugar, em *beads* de tamanho e intensidade de fluorescência diferentes, antígenos/anticorpos de interesse para avaliação de diferentes fatores, como presença de diferentes classes de imunoglobulinas e mediadores inflamatórios/citocinas ligadas à resposta imunológica.^(25,27)

Esta metodologia vem sendo utilizada no desenvolvimento de testes baseados em citometria de fluxo para o diagnóstico da COVID-19. Egia-Mendikute et al. e Fong et al.^(16,18) utilizaram *beads* funcionalizadas com streptavidina para ligação de antígenos biotinizados (S1 Spike, RBD e Nucleocapsídeo). As *beads* foram incubadas com soro para posterior marcação com anticorpos secundários anti-IgM e anti-IgG com diferentes fluorocromos. Para Egia-Mendikute et al.,⁽¹⁸⁾ a combinação de três antígenos proporcionou um teste mais específico e rápido para detecção de anticorpos, além de diminuir o limite de detecção quando comparado a um ensaio de ELISA. As duas metodologias foram superiores ao ELISA em sensibilidade e especificidade. Fong et al.⁽¹⁶⁾ apontam que testes com *beads* são superiores aos testes imunocromatográficos devido à facilidade de interpretação do teste (resultados fracamente positivos no teste imunocromatográfico podem gerar dúvidas de interpretação), além de fornecerem resultados quantitativos, possibilitando o acompanhamento da soroconversão.

De maneira original, Zattoni et al.⁽²⁹⁾ desenvolveram uma estratégia baseada em *beads* para a ligação covalente da proteína do nucleocapsídeo através da reação de conjugação sulfo-SMCC. O teste foi capaz de detectar anticorpos no soro do paciente usando uma diluição de 1:1000. O uso de um conjunto de três anticorpos secundários comerciais permitiu a detecção simultânea de IgG, IgM e IgA. De fato, a detecção de IgA foi realizada através do uso de anticorpo secundário biotinizado, com posterior incubação com streptavidina conjugada com fluorocromo, aumentando a sensibilidade da detecção. Importante ressaltar que este é o primeiro ensaio descrito na literatura que usa *beads* comerciais conhecidas como CBA (BD™ Cytometric Bead Array), possibilitando a detecção simultânea de IgG, IgM e IgA.

Testes para a identificação de anticorpos neutralizantes são outra possibilidade para o uso da estratégia baseada no uso de *beads*. O RBD é a porção da proteína Spike capaz de ligar na ECA-2 para infectar os tecidos. A ligação desta sequência proteica nas *beads* e incubação com ECA-2 biotinizada permite a avaliação da competição entre anticorpos neutralizante anti-RBD e ECA-2. Na ausência de anticorpos neutralizantes, as *beads* são marcadas pela formação do

complexo RBD-ECA-2-biotina-streptavidina, gerando sinal fluorescente pela streptavidina. Na presença de anticorpos neutralizantes, ocorre competição pela ligação na sequência RBD entre ECA-2 e anticorpo neutralizante e verifica-se a diminuição da marcação por streptavidina, portanto, quanto maiores os títulos de anticorpos neutralizantes, menor a fluorescência apresentada pela streptavidina.⁽³⁰⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de novos casos de infecções por SARS-CoV-2 no contexto pandêmico atual continua vital para a contenção da propagação viral, ainda mais com o surgimento de novas variantes com potencial infectante maior. Por outro lado, a vacinação em massa também demanda testes confiáveis para acompanhamento da imunidade coletiva.

A citometria de fluxo é uma técnica consolidada no diagnóstico laboratorial e utilizada como ferramenta com capacidade de triagem em grande escala e elevada confiabilidade. Diferentes testes com matrizes poliméricas e celulares para pesquisa de anticorpos foram desenvolvidos, porém as possibilidades de avanços tecnológicos se ampliam rapidamente. A estratégia baseada em *beads*, especialmente, permite a conjugação de diferentes proteínas e possibilita a pesquisa de vários antígenos simultaneamente, ampliando o espectro do resultado com inúmeras vantagens diagnósticas. No contexto, a inclusão de antígenos de outros vírus respiratórios pode permitir a pesquisa multiparamétrica para diferentes agentes infecciosos e a criação de painéis diagnósticos bastante completos, realizados em uma única análise.

Em síntese, a citometria de fluxo para uso diagnóstico tem potencial para se tornar uma ferramenta relevante no curso da pandemia da COVID-19 e futuros processos similares.

Abstract

The COVID-19 pandemic has had a devastating impact around the world and has led to the rapid development of diagnostic tests. Different technologies have been used to detect immunoglobulins produced against SARS-CoV-2 infection. Immunoenzymatic (ELISA), chemiluminescent and immunochromatographic assays are available and, in general, they have limited diagnostic accuracy, especially for the detection of IgA. Flow cytometry has emerged as an alternative for the development of sensitive and specific methods for COVID-19 applied for diagnosis, screening and stratification of the disease. Flow cytometry is a laser-based optical technology that detects physicochemical characteristics of cells or particles in a heterogeneous fluid. The article explores flow cytometry for the diagnosis of COVID-19 in two strategies for detecting antibodies in serum or plasma, the first one using viral antigens expressed on the surface of mammalian cells and the other one with these elements immobilized on microspheres (beads). The possibility of rapid detection of multiple antibodies simultaneously, with a small sample volume and high sensitivity and specificity, makes flow cytometry a promising methodology for the clinical laboratory, as a reference tool to help stop the COVID-19 pandemic process and similar future events.

Keywords

Flow cytometry; SARS-CoV-2; COVID-19; IgG, IgM and IgA antibodies

REFERÊNCIAS

- Worldometer. Coronavirus Cases [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 7]. Available from: https://www.worldometers.info/coronavirus/?utm_campaign=homeAdvegas1
- Kubina R, Dziedzic A. Molecular and serological tests for covid-19 a comparative review of SARS-COV-2 coronavirus laboratory and point-of-care diagnostics. *Diagnostics* (Basel, Switzerland). 2020 Jun;10(6) doi: 10.3390/diagnostics10060434
- Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* [Internet]. 2020;26(6):845–8 doi: 10.1038/s41591-020-0897-1
- Hsueh P-R, Huang L-M, Chen P-J, Kao C-L, Yang P-C. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 Dec;10(12):1062–6 <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01009.x>
- Ji T, Liu Z, Wang G, Guo X, Akbar khan S, Lai C, et al. Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2020;166:112455 doi: 10.1016/j.bios.2020.112455
- Anghebem MI, Rego FG de M, Picheth G. COVID-19 e Diabetes: a relação entre duas pandemias distintas. *Rev Bras Análises Clínicas*. 2020;52(2):28–33 doi: 10.21877/2448-3877.20200001
- Gunther N, Hoffmann GW. Qualitative dynamics of a network model of regulation of the immune system: a rationale for the IgM to IgG switch. *J Theor Biol*. 1982 Feb;94(4):815–22 doi: 10.1016/0022-5193(82)90080-7
- Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis an Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020 Jul;71(15):778–85 doi: 10.1093/cid/ciaa310
- Li G, Chen X, Xu A. Profile of Specific Antibodies to the SARS-Associated Coronavirus. *N Engl J Med* [Internet]. 2003;349(5):508–9 doi: 10.1056/NEJM200307313490520
- Padoan A, Sciacovelli L, Basso D, Negrini D, Zuin S, Cosma C, et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2020;507:164–6 doi: 10.1016/j.cca.2020.04.026
- Haveri A, Smura T, Kuivanen S, Österlund P, Hepojoki J, Ikonen N, et al. Serological and molecular findings during SARS-CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020;25(11) doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.11.2000266
- 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]. 2020;9(1):386–9 doi: 10.1080/22221751.2020.1729071
- Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* [Internet]. 2020;581(7809):465–9 doi: 10.1038/s41586-020-2196-x
- Chao YX, Röttschke O, Tan E-K. The role of IgA in COVID-19. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2020 Jul;87:182–3 doi: 10.1016/j.bbi.2020.05.057
- Huergo LF, Selim KA, Conzentino MS, Gerhardt ECM, Santos ARS, Wagner B, et al. Magnetic Bead-Based Immunoassay Allows Rapid, Inexpensive, and Quantitative Detection of Human SARS-CoV-2 Antibodies. *ACS sensors* [Internet]. 2021/01/26. 2021 Mar 26;6(3):703–8 doi: 10.1021/acssensors.0c02544
- Fong CH-Y, Cai J-P, Dissanayake TK, Chen L-L, Choi CY-K, Wong L-H, et al. Improved Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 by Microsphere-Based Antibody Assay. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020;21(18):1–10 doi: 10.3390/ijms21186595
- Pegoraro M, Militello V, Salvagno GL, Gaino S, Bassi A, Caloi C, et al. Evaluation of three immunochromatographic tests in COVID-19 serologic diagnosis and their clinical usefulness. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2021;40(4):897–900 <https://doi.org/10.1007/s10096-020-04040-1>
- Egia-Mendikute L, Bosch A, Prieto-Fernández E, Lee SY, Jiménez-Lasheras B, García del Río A, et al. Sensitive detection of SARS-CoV-2 seroconversion by flow cytometry reveals the presence of nucleoprotein-reactive antibodies in unexposed individuals. *Commun Biol* [Internet]. 2021;4(1):486 doi:10.1038/s42003-021-02011-6
- Gedezha MP, Mampeule N, Jugwanth S, Zwane N, David A, Burgers WA, et al. Performance of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies in South Africa. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(6):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252317>
- Lapiente D, Maier C, Irrgang P, Hübner J, Peter AS, Hoffmann M, et al. Rapid response flow cytometric assay for the detection of antibody responses to SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2021;40(4):751–9 doi: 10.1007/s10096-020-04072-7
- Simard C, Richard J, Bazin R, Finzi A, Trépanier P. Standardization of a flow cytometry SARS-CoV-2 serologic test. *MedRxiv*. 2021 doi: 10.1101/2021.01.29.21250770
- Horndler L, Delgado P, Abia D, Balabanov I, Martínez-Fleta P, Cornish G, et al. Flow cytometry multiplexed method for the detection of neutralizing human antibodies to the native SARS-CoV-2 spike protein. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2021;13(3):e13549 doi: 10.15252/emmm.202013549
- Piñero P, Marco De La Calle FM, Horndler L, Alarcón B, Uribe Barrientos M, Sarmiento H, et al. Flow cytometry detection of sustained humoral immune response (IgG + IgA) against native spike glycoprotein in asymptomatic/mild SARS-CoV-2 infection. *Sci Rep*. 2021 May;11(1):10716 doi: 10.1038/s41598-021-90054-4
- Goh YS, Chavatte JM, Lim Jieling A, Lee B, Hor PX, Amrun SN, et al. Sensitive detection of total anti-Spike antibodies and isotype switching in asymptomatic and symptomatic individuals with COVID-19. *Cell Reports Med* [Internet]. 2021;2(2):100193 doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100193
- Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol* [Internet]. 2004;110(3):252–66 doi: 10.1016/j.clim.2003.11.017
- Parsa SF, Vafajoo A, Rostami A, Salarian R, Rabiee M, Rabiee N, et al. Early diagnosis of disease using microbead array technology: A review. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2018;1032:1–17 doi: 10.1016/j.aca.2018.05.011
- Antal-Szalmás P, Nagy B, Debreceni IB, Kappelmayer J. Measurement of Soluble Biomarkers by Flow Cytometry. *EJIFCC* [Internet]. 2013 Jan;23(4):135–42.
- Hattori T, Koide A, Panchenko T, Romero LA, Teng KW, Corrado AD, et al. Multiplex bead binding assays using off-the-shelf components and common flow cytometers. *J Immunol Methods* [Internet]. 2021;490:112952 <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112952>
- Zattoni IF, Huergo LF, Gerhardt ECM, Nardin JM, dos Santos AMF, Rego FG de M, et al. Multiplexed flow cytometric approach for detection of anti-SARS-CoV-2 IgG, IgM and IgA using beads covalently coupled to the nucleocapsid protein. *ChemRxiv*. 2021;1–17 <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.14219999.v1>
- Tian L, Elsheikh EB, Patrone PN, Kearsley AJ, Gaigalas AK, Inwood S, et al. Towards Quantitative and Standardized Serological and Neutralization Assays for COVID-19. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(5):1–15 doi: 10.3390/ijms22052723

Correspondência

Vivian Rotuno Moure

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil
Av. Prefeito Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico,
Curitiba - PR, 80210-170 - E-mail: vivian.moure@ufpr.br

Vacinação em mulheres gestantes, puérperas e lactantes

Vaccination in pregnant, puerperal and lactating women

Maria do Socorro Ferreira Martins¹

Sarah Laís Silva de Freitas²

Catherine Sonaly Ferreira Martins³

Resumo

Em março de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o início de uma pandemia devastadora causada pelo vírus SARS-CoV-2. Desde então, evidências científicas acumuladas mostram que gestantes e puérperas configuram grupos de risco para complicações obstétricas, hospitalizações, mortes maternas, prematuridade e óbitos fetais, diferente dos resultados publicados no início da pandemia. Estudos preliminares já evidenciam que a vacinação nas gestantes e puérperas é benéfica e segura para o trinômio mãe-feto-lactente. Os imunizantes atualmente disponibilizados pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI) são funcionalmente inativados, não contendo nenhum componente vivo em suas formulações, semelhantes às outras vacinas já utilizadas no calendário de vacinação das gestantes. Além disso, nos estudos experimentais em animais não foi identificado nenhum efeito teratogênico. O Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação da Covid-19, na sua 8ª edição, contempla a vacinação para as gestantes e puérperas acima de 18 anos com e sem comorbidades. Após a vacinação em grande escala realizada em vários países com imunizantes vetoriais não replicantes (Oxford / AstraZeneca/Fiocruz e Johnson & Johnson), observou-se eventos adversos raríssimos e graves da síndrome de trombose com trombocitopenia (TTS). Atendendo à solicitação da ANVISA, o Plano Nacional de Imunizações suspendeu temporariamente a vacinação das gestantes e puérperas com vacinas que utilizem essa plataforma, após um caso notificado com uma gestante, na cidade do Rio de Janeiro que resultou em óbito materno e fetal, com possível associação de causalidade.

Palavras-chave

Vacinas contra COVID-19; gestantes; puérperas; lactantes; eventos adversos

INTRODUÇÃO

A COVID-19, doença causada pelo novo Coronavírus (SARS-CoV-2), surpreendeu o mundo por ter rápida disseminação e ser potencialmente grave. Os estudos publicados no início da pandemia com gestantes e puérperas sobre a COVID-19 não considerava que esse grupo de mulheres seria de risco e que não apresentariam uma maior probabilidade de desenvolver formas graves da doença com complicações obstétricas evoluindo com hospitalizações e mortes, como também uma maior ocorrência de prematuridade e óbito fetal.⁽¹⁾

No ano de 2020, estatísticas divulgadas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados

Unidos da América apontaram que gestantes estão em risco maior para internação em unidades de tratamento intensivo e para intubação.⁽²⁻⁴⁾ Em síntese, apesar das gestantes não apresentarem maior risco de contrair a doença, quando infectadas podem ter uma evolução pior do que mulheres da mesma idade que não estão grávidas.⁽⁵⁾

De acordo com análise dos dados publicados do Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Gripe (SIVEP GRIPE), houve aumento importante da mortalidade materna por COVID-19 no Brasil, sendo até o dia 02 de junho de 2021 notificados 455 casos em 2020 e 814 em 2021⁽⁶⁾. Isto representa 10 mortes maternas por semana em 2020 e 38 mortes maternas por semana em 2021. Tanto nos casos de SRAG, como nos de SRAG confirmados para

¹ Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande, PB, Brasil. Presidente do Comitê de Imunizações da Sociedade Paraibana de Pediatria, Membro do Departamento Científico da Sociedade Brasileira de Pediatria, Profa. do Curso de Medicina do Centro Universitário Facisa (Unifacisa). Campina Grande, PB, Brasil.

² Acadêmica de Medicina da Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, PB, Brasil.

³ Professora de Alergia e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, PB, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100964

COVID-19, a idade gestacional mais frequente é o terceiro trimestre⁽⁶⁾. Comparando os anos de 2020 e 2021, a mortalidade materna semanal aumentou em 283% e a mortalidade da população em geral em 105%, confirmando os achados do CDC de que gestantes constituem grupo de maior risco para complicações e óbito decorrente da COVID-19.

OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi apresentar uma breve revisão do impacto da COVID-19 nas gestantes, puérperas e lactantes e avaliar alguns fatores de risco relacionados à saúde dessa população como também as recomendações específicas da vacinação contra a COVID-19 nesse grupo, além de relatar eventos adversos raros observados com um dos imunizantes.

A metodologia empregada foi através da seleção aleatória de artigos e publicações mais recentes sobre o tema, como as notas técnicas atualizadas emitidas pelo Ministério da Saúde.

VACINAS ATUALMENTE RECOMENDADAS PARA GESTANTES E PUÉRPERAS NO BRASIL

Nenhuma das vacinas em uso atualmente, tanto no Brasil como no mundo, incluiu gestantes nos estudos de fase 3. Segundo o MS, as vacinas Sinovac/Butantan (Coronavac®) e Pfizer/BioNTech (Comirnaty®), que passam a ser disponibilizadas para as gestantes no Brasil, são de categoria B (nos estudos realizados em animais não foram observados efeitos teratogênicos) e estão descritas nas suas respectivas bulas.⁽⁷⁾

A vacina Coronavac®, de vírus inativado, é produzida com tecnologia semelhante às atualmente ofertadas para gestantes no calendário para esse grupo no PNI⁽⁸⁾. Já a vacina da Pfizer/BioNTech (Comirnaty®) utiliza uma plataforma inovadora, de RNA mensageiro⁽⁷⁾. Nos EUA, esta última foi recomendada para gestantes de risco e os dados de monitoramento publicados até o momento demonstram segurança de seu uso nessa condição, confirmado por recentes publicações.^(9,10)

SUSPENSÃO DA VACINA ASTRAZENECA/FIOCRUZ

As vacinas COVID-19 em uso no Brasil não foram avaliadas em estudos de fase 3 em gestantes e puérperas e, portanto, não possuem indicação para uso em bula de maneira indiscriminada, sendo seu uso recomendado apenas após avaliação do risco-benefício.⁽¹¹⁾ Os dados de segurança para uso na gestação provêm sobretudo de estudos em animais, que não demonstraram riscos aumentados de complicação, bem como de relatos de uso pós-implantação nos diversos países.⁽¹¹⁾

A gestação por si só é uma condição com risco aumentado de eventos de trombose e sangramento.⁽¹²⁾ Contudo, não há evidências de que ela seria um fator de risco para a ocorrência da síndrome de trombose com trombocitopenia (TTS).⁽¹²⁾ Considerando o mecanismo fisiopatológico proposto e específico para esta síndrome (presença de autoanticorpos contra o fator 4 plaquetário), não é esperado que haja um risco aumentado de ocorrência da síndrome em indivíduos que possuam outros fatores predisponentes para trombose, incluindo gestantes.⁽¹²⁾ A exceção são indivíduos que apresentaram quadro prévio de trombocitopenia induzida por heparina.⁽¹²⁾

A suspensão temporária da vacina AstraZeneca/Fiocruz em gestantes e puérperas é resultado do monitoramento e vigilância de eventos adversos com as vacinas COVID-19 que estão sendo utilizadas no Brasil.⁽¹³⁾

Após o recebimento da notificação de um caso de TTS em gestante que resultou em óbito materno e fetal, com possível associação causal com a vacina AstraZeneca/Fiocruz no estado do Rio de Janeiro, o caso foi avaliado pela Câmara Técnica Assessora em Farmacovigilância de Vacinas e outros Imunobiológicos (CTAFavi), tendo sido classificado como nível 2 de certeza diagnóstica (caso provável).⁽¹³⁾ Trata-se de uma síndrome extremamente rara, inicialmente descrita na Europa, com incidência estimada ao redor de um caso para cada 100 mil doses administradas da vacina. Até o momento não haviam sido notificados casos desta síndrome em gestantes em todo o mundo.⁽¹³⁾

As gestantes e puérperas que já receberam dose(s) da vacina AstraZeneca/Fiocruz devem ser orientadas a procurar atendimento médico imediato se apresentar nos 4 a 28 dias seguintes à vacinação os seguintes sintomas: falta de ar, dor no peito, inchaço em perna, dor abdominal persistente, sintomas neurológicos, como dor de cabeça persistente e de forte intensidade, visão borrada, dificuldade na fala ou sonolência, pequenas manchas avermelhadas na pele além do local em que foi aplicada a vacina.⁽¹⁴⁾

Os trabalhadores da saúde deverão ficar atentos para os sinais e sintomas da síndrome de TTS e as recomendações de manejo adequado, conforme detalhado na Nota técnica n.º 441 /2021 – CGPNI/DEIDT/SVS/MS.⁽¹⁴⁾

É importante que seja esclarecido que uma identificação precoce dos sintomas relacionados a possíveis eventos adversos pós-vacinação (EAPV) à vacina Oxford/AstraZeneca/Fiocruz e com uma intervenção terapêutica adequada, a letalidade para esses casos diminui bastante.

RECOMENDAÇÕES ATUAIS DO PNI SOBRE A VACINAÇÃO NAS GESTANTES E PUÉRPERAS E LACTANTES

A Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO), a Sociedade Brasileira de Imunizações

(SBIm), a Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) e a Associação Médica Brasileira (AMB) reforçam que a COVID-19 em gestantes está associada a risco elevado de morbidade e mortalidade materna, além do maior risco de prematuridade e óbito fetal.⁽¹⁵⁾

Considerando a avaliação do perfil de risco-benefício da vacinação contra a COVID-19 em gestantes e puérperas até 45 dias do pós-parto, o PNI entende que neste momento o perfil de risco-benefício neste grupo seja altamente favorável à vacinação e faz as seguintes recomendações:⁽¹³⁾

- a) Vacinar gestantes e puérperas (até 45 dias após o parto), a partir de 18 anos, como grupo prioritário independentemente da presença de fatores de risco adicional.
- b) A vacinação das gestantes e puérperas (até 45 dias após o parto), a partir de 18 anos, deverá ser realizada com as vacinas que não contenham vetor viral (Sinovac/Butantan e Pfizer/Wyeth), não estando recomendado intercambialidade entre laboratórios produtores para aquelas que receberam sua primeira dose com o imunizante AstraZeneca/Oxford.
- c) A vacinação poderá ser realizada em qualquer trimestre da gestação.
- d) A vacinação das gestantes e puérperas (até 45 dias após o parto), a partir de 18 anos, deverá ser condicionada a uma avaliação individualizada, compartilhada entre a gestante e seu médico, do perfil de risco-benefício, considerando as evidências e incertezas disponíveis até o momento.
- e) A vacinação poderá ser realizada em lactantes que pertençam a algum dos grupos prioritários já elencados,

no momento da convocação do respectivo grupo, não sendo necessária a interrupção da lactação, no entanto a lactação em si não será considerada como prioritária para a vacinação.

- f) Para a vacinação das gestantes e puérperas deverá ser exigido prescrição médica.

Os dados fornecidos pelo Ministério da Saúde de janeiro a maio de 2021, estão presentes na Tabela 1 e na Tabela 2, do total de doses aplicadas das vacinas da COVID-19 em gestantes e puérperas no Brasil e a incidência de eventos adversos notificados para cada 100 mil doses aplicadas dos respectivos imunizantes.⁽¹⁵⁾

Trabalhos preliminares publicados em vários países mostraram também o provável benefício da vacinação das gestantes trazendo proteção para o feto e o bebê, através dos anticorpos transplacentários da classe IgG, mas ainda precisamos saber o nível dessa proteção para diversas vacinas, por quanto tempo protegerá essa criança e se essa proteção será a mesma para os diferentes desfechos de leve, moderado ou grave.^(16,17)

VACINAÇÃO NAS LACTANTES

A OMS, a SBP e outras entidades internacionais se posicionaram claramente a favor da vacinação nesse grupo de lactantes, mesmo não sendo considerado como prioritário; sua recomendação atual de vacinação é para aquelas lactantes com comorbidades ou pertencentes a grupo de alto risco ocupacional, enquanto não dispomos

Tabela 1 - Distribuição das doses aplicadas de vacinas para COVID-19 em gestantes durante os meses de janeiro até maio de 2021.

Imunobiológicos	Doses aplicadas		
	Dose 1	Dose 2	Total
AstraZeneca/Fiocruz	37.455	1.134	38.589
Sinovac/Butantan	6.760	2.989	9.678
Pfizer/Wyeth	39.342	23	39.365
Total	83.577	4.055	87.639

Fonte: CGPNI/DEIDT/SVSMS.

Tabela 2 - Eventos adversos notificados em gestantes com registro nominal de vacinação contra a COVID-19, período de janeiro a maio de 2021, Brasil.

	AstraZeneca/ Fiocruz	Incidência*	Sinovac/ Butantan	Incidência*	Pfizer/ Wyeth	Incidência*	Total
Graves	19	49,2	0	0,0	5	12,70164	24
Óbitos	3	7,8	0	0,0	1	2,540328	4
Não grave	357	925,1	40	413,3	18	45,7259	415
Total	376	974,4	40	413,3	23	58,42754	439

*Incidência por 100 mil doses administradas.

Fonte: CGPNI/DEIT/SVSMS.

de estudos. A OMS não preconiza a interrupção da amamentação após a vacinação.⁽⁸⁾

São citadas como referências as orientações vacinais do CDC que, por seu comitê de imunizações Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), defende ser altamente improvável que os componentes das vacinas contra COVID-19 possam ser excretados no leite materno e, mesmo que o fossem, seriam digeridos no intestino dos lactentes.⁽¹⁸⁾ O CDC ainda confirma que atualmente nenhuma das vacinas utiliza vírus vivos e, portanto, não podem provocar a doença COVID-19 e nem alterar o material genético de quem as recebe.⁽¹⁸⁾

As vacinas inativadas têm sido utilizadas há décadas em lactantes, sem nenhum risco ou prejuízo ao recém-nascido ou lactente. O puerpério, inclusive, é considerado um excelente momento de atualização do calendário vacinal da mulher.

O E-lactancia, site destinado principalmente a estudos de compatibilidade ou não de medicamentos e substâncias utilizadas pela mulher durante a amamentação, se posiciona a favor da vacinação de lactantes (situação bastante segura, provavelmente compatível, risco leve ou pouco provável), citando nominalmente as vacinas da Pfizer, Moderna e Oxford.⁽¹⁰⁾

A Academia Médica de Aleitamento Materno (ABM) confirma que há pouca plausibilidade biológica de que a vacina cause danos aos lactentes e chama a atenção para os anticorpos (IgA secretória contra o SARS-CoV-2) provenientes do leite de mulheres vacinadas que podem proteger a criança amamentada, como já temos estudos mostrando essas evidências, mas ainda não sabemos se no total de anticorpos recebidos pelo bebê os valores são os mesmos para todas as vacinas e por quanto tempo a criança ficará protegida.⁽¹⁹⁾ Um benefício claro da vacinação da lactante é propiciar a proteção destas mulheres contra a COVID-19, diminuindo, portanto, o risco teórico de transmitir a infecção aos filhos destas mães vacinadas.

Espera-se que em um futuro próximo sejam ofertadas vacinas em quantidade suficiente para vacinação universal de gestantes, puérperas e lactantes, pois ao se vacinar esse grupo de mulheres, além de evitar seu adoecimento também protege indiretamente seus bebês.

CONCLUSÃO

A falta de ensaios clínicos nas pesquisas com gestantes, puérperas e lactantes, torna a vacinação desse grupo um assunto muito controverso e sem unanimidade nas suas recomendações, seja pelas entidades internacionais, nacionais ou sociedades científicas. Diante desse contexto pandêmico, avaliando risco da doença *versus* benefício alcançado pela vacinação, o PNI decide vacinar gestantes e puérperas (até 45 dias após o parto), a partir de 18 anos, como grupo prioritário independentemente da presença de

fatores de risco adicional, e deverá ser realizada com as vacinas que não contenham vetor viral (Sinovac/Butantan e Pfizer/Wyeth), podendo ser realizada em qualquer trimestre da gestação. Deverá ser condicionada a uma avaliação individualizada, compartilhada entre a gestante e seu médico, considerando as evidências e incertezas disponíveis até o momento. O Ministério da Saúde aguarda uma posição da OMS sobre o assunto, como também novas evidências científicas e dados epidemiológicos para novas recomendações.

Abstract

In march 2020, the World Health Organization announced the onset of a devastating pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus. Since then, accumulated scientific evidence have been showing that pregnant and postpartum women are at risk groups for obstetric complications, hospitalizations, maternal deaths, prematurity and fetal deaths, unlike the results obtained at the beginning of the pandemic. Preliminary studies have already shown that vaccination in pregnant women is beneficial and safe for the mother-fetus/infant trinomial. Covid-19 vaccines currently available on the National Program Immunization (PNI) don't contain any live component in their formulations and they are similar to other inactivated vaccines that have been already used safely in the vaccination schedule of pregnant women. Furthermore, experimental studies in animals did not identify any teratogenic effects so far. The 8th edition of Covid-19 National Plan for the Operationalization of Vaccination, advise to perform Covid-19 vaccination in pregnant and postpartum women over 18 years of age with comorbidities. However, some states are following their own guidelines, and to recommend immunizing even those without comorbidities. After large-scale vaccination carried out in several countries with non-replicating vector immunizing agents (Oxford / AstraZeneca / Fiocruz and Johnson & Johnson), very rare and serious adverse events of thrombocytopenic thrombocytosis (TT) were observed. In response to ANVISA's request, the PNI temporarily suspended the vaccination of pregnant and postpartum women with vaccines that use this platform, after a case reported with a pregnant woman in the city of Rio de Janeiro that resulted in maternal and fetal death, with a possible association with the Oxford / AstraZeneca / Fiocruz vaccine. Additionally, the PNI interrupted the vaccination of pregnant and postpartum women without comorbidities or risk factors for infection with any immunizing agent using this immunizing.

Keywords

Covid-19 vaccines; pregnant women; postpartum women; breastfeeding women; adverse events to vaccines

REFERÊNCIAS

1. AstraZeneca's COVID-19 vaccine: EMA finds possible link to very rare cases of unusual blood clots with low blood platelets | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/astrazenecas-covid-19-vaccine-ema-finds-possible-link-very-rare-cases-unusual-blood-clots-low-blood>
2. Villar J, Ariff S, Gunier RB, Thiruvengadam R, Rauch S, Kholin A, et al. Maternal and Neonatal Morbidity and Mortality Among Pregnant Women With and Without COVID-19 Infection: The INTERCOVID Multinational Cohort Study. JAMA Pediatr [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 13]; Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/fullarticle/2779182>
3. Conjuntos de dados - Open Data [Internet]. [cited 2021 Jul 16]. Available from: <https://opendatasus.saude.gov.br/dataset?tags=SRAG>
4. Observatório Obstétrico Brasileiro COVID-19 [Internet]. [cited 2021 Jul 16]. Available from: https://observatorioobstetrico.shinyapps.io/covid_gesta_puerp_br/

5. Rasmussen SA, Jamieson DJ. Pregnancy, Postpartum Care, and COVID-19 Vaccination in 2021. *JAMA* [Internet]. 2021 Mar 16 [cited 2021 Jul 13];325(11):1099–100. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2776447>
6. Boletim Epidemiológico Especial - Doença pelo Novo Coronavírus – COVID-19 [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 17]. Available from: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/julho/02/69_boletim_epidemiologico_covid_2junho.pdf
7. Ministério da Saúde. Nota técnica N° 651/2021-CGPNI/DEIDT/SVS/MS [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/maio/19/nota-tecnica-651-2021-cgpn-deidt-svs-ms.pdf>
8. Vacina absorvida covid-19 (inativada) [Internet]. Instituto Butantan. [cited 2021 Jul 13]. Available from: https://vacinacovid.butantan.gov.br/assets/arquivos/Bulas_Anvisa/2021.04.23 - Bula profissional da saúde.pdf
9. The American College of Obstetricians and Gynecologists. COVID-19 Vaccination Considerations for Obstetric–Gynecologic Care | ACOG [Internet]. [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/practice-advisory/articles/2020/12/covid-19-vaccination-considerations-for-obstetric-gynecologic-care>
10. Baden LR, Sahly HM El, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389> [Internet]. 2020 Dec 30 [cited 2021 Jul 13];384(5):403–16. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2035389>
11. Male V. Are COVID-19 vaccines safe in pregnancy? *Nat Rev Immunol* 2021 214 [Internet]. 2021 Mar 3 [cited 2021 Jul 16];21(4):200–1. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-021-00525-y>
12. Scully M, Singh D, Lown R, Poles, A, Solomon T, Levi M, et al. Pathologic Antibodies to Platelet Factor 4 after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Jun 10 [cited 2021 Jul 16];384(23):2202–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33861525/>
13. Ministério da Saúde. Nota técnica n° 2/2021 - SECOVID/GAB/SECOVID/MS [Internet]. [cited 2021 Jul 17]. Available from: https://sei.saude.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&codigo_verificador=0021464579&codigo_crc=4863F560&hash_download=3cfd43ffbcba4b08f37ce10fc87697b0116fa8bbb63303a6110477124d1d99cd053c45d86c748bfe31764f024e1f046f2de39d9289b8534bdbbb87ed5c878df&visualizacao=1&id_orgao_acesso_externo=0
14. Ministério da Saúde. Nota técnica n° 441/2021-CGPNI/DEIDT/SVS/MS [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/04/nota-tecnica-441-2021-cgpn-deidt-svs-ms.pdf>
15. Ministério da Saúde. Boletim 011/2021: Eventos Adversos em gestantes e puérperas e a vacinação contra a Covid-19 - AMB [Internet]. [cited 2021 Jul 17]. Available from: <https://amb.org.br/cem-covid/boletim-011-2021-cem-covid-veventos-adversos-em-gestantes-e-uerperas-e-a-vacinacao-contra-a-covid-19/>
16. Collier AY, McMahan K, Yu J, Tostanoski LH, Aguayo R, Ansel J, et al. Immunogenicity of COVID-19 mRNA Vaccines in Pregnant and Lactating Women. *JAMA* [Internet]. 2021 Jun 15 [cited 2021 Jul 16];325(23):2370–80. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2780202>
17. Gray KJ, Bordt EA, Atyeo C, Deriso E, Akinwunmi B, Young N, et al. Coronavirus disease 2019 vaccine response in pregnant and lactating women: a cohort study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2021 [cited 2021 Jul 16];0(0). Available from: <http://www.ajog.org/article/S0002937821001873/fulltext>
18. CDC - Recommendations - Pregnancy [Internet]. [cited 2021 Jul 16]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/recommendations/pregnancy.html>
19. Academy of Breastfeeding Medicine [Internet]. [cited 2021 Jul 17]. Available from: <https://abm.memberclicks.net/abm-statementconsiderations-for-covid-19-vaccination-inlactation>

Correspondência

Maria do Socorro Ferreira Martins
 Universidade Federal de Campina Grande
 maria.socorro@maisunifacisa.com.br

Alterações laboratoriais em gestantes e puérperas com diagnóstico confirmatório de COVID-19

Laboratory test alterations in pregnant and puerperal women diagnosed with COVID-19

Jéssica Sales Araújo de Albuquerque¹

José Nilson Ferreira Gomes Neto²

Hannah Iorio Dias³

Mariana de Oliveira Brizeno⁴

Francisco Cardoso dos Santos Neto⁵

Francisca Jéssica Magalhães Timbó¹

Jeanine Moraes Pereira¹

Resumo

Objetivo: Analisar as alterações de exames laboratoriais de gestantes e puérperas com diagnóstico laboratorial de COVID-19 atendidas em uma maternidade de referência em Fortaleza/Ceará, no período de março a outubro de 2020. **Métodos:** Trata-se de um estudo retrospectivo, descritivo, com abordagem quantitativa, envolvendo análise de dados dos exames laboratoriais de pacientes com diagnóstico confirmatório para COVID-19 no período de março a outubro de 2020. Os dados foram coletados a partir dos resultados de exames obtidos nas plataformas institucionais, revisão de dados e evoluções do prontuário físico e eletrônico. **Resultados:** As pacientes apresentaram notória redução de hemoglobina e hematócrito, leucocitose com linfopenia e alteração de parâmetros bioquímicos de função hepática. Na amostra estudada, obteve-se um percentual de óbitos de 5%. Além disso, evidenciou-se alteração de marcadores de inflamação e coagulação, dados que corroboram com os estudos na área. **Conclusão:** As alterações específicas da COVID-19 foram detectadas nos dois grupos de pacientes, ressaltando-se a importância da realização de novos estudos com enfoque na população gestante e puérpera, pois as consequências da doença nessa população podem afetar diretamente o binômio mãe-bebê.

Palavras-chave

Coronavírus; Gestantes; Teste laboratorial

INTRODUÇÃO

Coronavírus é um RNA vírus zoonótico, da ordem Nidovirales e família *Coronaviridae*. Esta é uma família de vírus responsável por processos infecciosos no trato respiratório, isolados pela primeira vez em 1937.⁽¹⁾

Em dezembro de 2019 ocorreu o primeiro caso de uma pneumonia atípica, posteriormente associada a um agente etiológico conhecido como novo Coronavírus, SARS-CoV-2, identificado em Wuhan, na China, no dia 31 de dezembro.⁽²⁾

Desde então, os casos começaram a se espalhar rapidamente pelo mundo, iniciando no continente asiático e com

disseminação praticamente imediata por outros países. Em fevereiro, a COVID-19, nome dado à doença causada pelo SARS-CoV-2, chamou atenção pelo aumento exponencial de novos casos e mortes no Irã e na Itália, além do colapso dos sistemas de saúde.⁽¹⁾

A transmissão do SARS-CoV-2 de pessoa para pessoa se dá por meio da autoinoculação do vírus em membranas mucosas (nariz, olhos ou boca) e do contato com superfícies inanimadas contaminadas, o que alerta para a necessidade de adoção rápida e preventiva de medidas de proteção humana, a fim de impedir a propagação da doença entre as pessoas.⁽³⁾ A sintomatologia da COVID-19 é ampla e

¹ Residente em atenção hospitalar à saúde com ênfase em saúde da mulher e da criança no Complexo Hospitalar da UFC e graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE, Brasil.

² Mestre em Ciências Farmacêuticas e graduado em Farmácia com Habilitação em Análises Clínicas, pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Farmacêutico do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará (CH/UFC-EBSERH). Fortaleza, CE, Brasil.

³ Mestrado em Saúde da Mulher e da Criança pela UFC (2018) e graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará - UFC - (2004). Farmacêutica do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará (CH/UFC-EBSERH). Fortaleza, CE, Brasil.

⁴ Mestre em Ciências Farmacêuticas (2004) e graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará (2000). Fortaleza, CE, Brasil. Farmacêutica do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará (CH/UFC-EBSERH). Fortaleza, CE, Brasil.

⁵ Residente em atenção hospitalar à saúde com ênfase em saúde da mulher e da criança no Complexo Hospitalar da UFC e graduado em Farmácia pela Universidade Federal do Piauí (2019). Teresina, PI, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102090

pode variar desde quadros gripais leves, incluindo tosse, coriza e dores de garganta, até pneumonias severas, com necessidade de ventilação mecânica ou auxílio respiratório.⁽¹⁾

A partir da observação clínica e epidemiologia da doença, os indivíduos idosos e acometidos por condições clínicas preexistentes (como hipertensão, cardiopatias, doenças pulmonares, câncer) foram elencados como a população mais suscetível a desenvolver quadros severos de COVID-19. Nesse contexto, o Ministério da Saúde incluiu, por meio da nota técnica número 12 do presente ano, gestantes e puérperas na população considerada de risco para a doença.⁽⁴⁾

Os Coronavírus podem causar resultados adversos graves na gestação, como aborto espontâneo, parto prematuro, restrição de crescimento intrauterino e morte materna. Apesar da transmissão vertical do SARS-CoV-2 ainda não ter sido completamente elucidada, a transmissão perinatal foi suspeita em um relato de caso publicado na literatura.⁽⁴⁾

O diagnóstico preciso da COVID-19 é dado através do teste molecular para o SARS-CoV-2, coletando amostras obtidas por *swab* nasofaríngeo para identificação do vírus (preferencialmente realizado entre o terceiro e sétimo dia após início dos sintomas) ou testes sorológicos para identificação de anticorpos (após o sétimo dia de sintomatologia).⁽¹⁾

No entanto, a partir da experiência clínica e relatos internacionais, a doença foi percebida como multissistêmica, capaz de atingir diversos órgãos e tecidos e apresentar manifestações além das respiratórias, incluindo distúrbios de coagulação, injúria miocárdica, falência múltiplas de órgãos, entre outros.⁽²⁾

Associadas aos exames diagnósticos, as análises laboratoriais complementares possibilitam avaliar a evolução, surgimento e progressão de disfunções orgânicas, assim como acompanhamento da melhora ou deterioração clínica do paciente. Através dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, pode-se nortear a conduta multiprofissional, reavaliar diariamente a necessidade e eficácia da terapia medicamentosa, bem como planejar racionalmente as abordagens ao paciente.⁽⁵⁾

OBJETIVOS

Gerais

Analisar as alterações de exames laboratoriais de gestantes e puérperas com diagnóstico laboratorial de COVID-19 atendidas em uma maternidade de referência em Fortaleza/Ceará, no período de março a outubro de 2020.

Específicos

Descrever o perfil clínico e epidemiológico de gestantes e puérperas diagnosticadas com COVID-19 na instituição e descrever os desfechos clínicos vivenciados pelas mulheres diagnosticadas com COVID-19.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, descritivo, com abordagem quantitativa, envolvendo análise de dados dos exames laboratoriais de pacientes com diagnóstico confirmatório para COVID-19 no período de março a outubro de 2020. Os dados foram coletados a partir dos resultados de exames obtidos nas plataformas institucionais, revisão de dados e evoluções do prontuário físico e eletrônico. As variáveis analisadas foram os parâmetros hematológicos (eritrograma, leucograma, plaquetograma, coagulograma, dímero-D, fibrinogênio) e bioquímicos das pacientes (marcadores de função renal, hepática, proteína C reativa, eletrólitos, ferritina, creatinofosfoquinase, bilirrubina total e frações, lactato desidrogenase, colesterol total e frações), idade, data de diagnóstico, desfecho clínico.

Foram incluídas na pesquisa todas as pacientes com diagnóstico laboratorial positivo para COVID-19 através de *swab* nasofaríngeo com detecção de SARS-CoV-2, testes rápidos ou sorologia com identificação de anticorpos IgM, atendidas na instituição no período entre março e outubro de 2020. Foram excluídas do estudo as pacientes cujos laudos diagnósticos de COVID-19 não puderam ser encontrados nos prontuários ou plataformas institucionais. Os dados foram armazenados no programa Microsoft Excel 2013 e, posteriormente, submetidos à análise estatística descritiva simples, sendo apresentados sob a forma de gráficos e tabelas.

ÉTICA

O estudo foi projetado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o parecer de número 4.246.813.

RESULTADOS

Durante o período de março a outubro, foram notificadas no Núcleo de Vigilância Epidemiológica (NUVE) da instituição, 43 pacientes com diagnóstico confirmatório por teste rápido com IgM e *swab* nasofaríngeo com detecção de SARS-CoV-2.

As notificações foram classificadas quanto à gravidade do quadro respiratório como síndrome gripal (SG) ou síndrome respiratória aguda grave (SRAG). A síndrome gripal era caracterizada por pelo menos dois dos seguintes sintomas: febre (mesmo que referida), calafrios, dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza, distúrbios olfativos ou distúrbios gustativos. Para classificação de SRAG, seria um indivíduo com síndrome gripal que apresentasse: dispneia/

desconforto respiratório OU pressão persistente no tórax OU saturação de O₂ menor que 95% em ar ambiente OU coloração azulada dos lábios ou rosto.

Em relação às características dessa população, a faixa etária média do grupo com SG foi de 27,8 anos e 24,7 para SRAG.

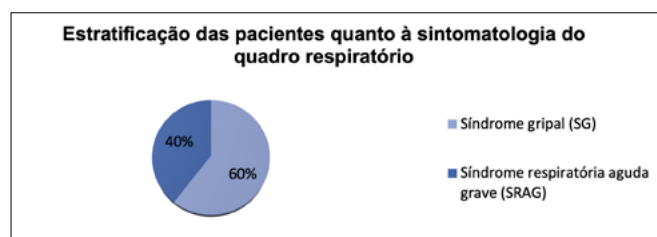


Gráfico 1. Estratificação das pacientes quanto à sintomatologia do quadro respiratório.

Conforme demonstrado no Gráfico 1, 26 (60%) pacientes apresentaram SG e 17 (40%) SRAG. Três pacientes foram excluídas da análise dos exames laboratoriais por não apresentarem nenhum registro de exame na instituição durante o período de internação. No grupo de SRAG ocorreram dois óbitos, representando 5% da amostra total de pacientes.

Em relação à presença/ausência de comorbidades, 46,2% das pacientes com SG apresentaram pelo menos uma, entre elas: asma, *diabetes mellitus* gestacional, síndrome HELLP, hipertensão arterial e insuficiência renal. No grupo com SRAG, 58,8% das pacientes eram acometidas por pelo menos um dos seguintes fatores: obesidade, *diabetes mellitus* gestacional, insuficiência renal, asma, hipertensão gestacional.

Conforme descrito na Tabela 1, entre as pacientes classificadas com síndrome gripal, todas as que apresentaram leucocitose (76,2%) cursaram com neutrofilia ($>7500/\text{mm}^3$), com 28,6% dessas apresentando desvio à esquerda e presença de mais de 500 bastonetes por milímetro cúbico no leucograma. Considerando as pacientes

de SRAG com leucocitose, 78,6% apresentaram neutrofilia sem desvio à esquerda.

A linfopenia (< 800 linfócitos/ mm^3)⁽⁶⁾ foi observada em 66,7% das pacientes com SG e 64,7% em SRAG. As contagens de monócitos (referência: 80-1000/ mm^3)⁽⁶⁾, basófilos (referência: 0-150/ mm^3)⁽⁶⁾ e eosinófilos (referência: 40-600/ mm^3)⁽⁶⁾ mantiveram-se dentro da normalidade nos dois grupos de pacientes.

No grupo com SG, a função renal foi avaliada em 21 pacientes (86,9% da amostra total). Dessas, 61,9% apresentam valores normais de ureia e creatinina (considerando valores de referência entre 10 e 50 mg/dL para ureia e 0,6 a 1,1 mg/dL para creatinina);⁽⁶⁾ 19,05% apresentaram prejuízo da função renal com valores elevados desses parâmetros e 19,05% apresentaram valores abaixo dos de referência. No outro grupo de pacientes, foram avaliadas 14 mulheres (82,4% da amostra total). Dessas, 71,4% apresentam valores normais de ureia e creatinina e 28,6% apresentaram prejuízo da função renal com valores aumentados. As alterações de transaminases hepáticas foram mais evidenciadas no grupo com síndrome gripal, o que pode ser justificado também pelo maior número de pacientes avaliadas (16) em relação às com SRAG (12).

A gama-glutamyltransferase (GGT ou gama GT) é uma enzima que se encontra em diversos órgãos do corpo, como rim, fígado, vesícula biliar, baço e pâncreas. Entre estes, o fígado é a principal fonte de GGT no sangue, contribuindo na avaliação da função hepática. Apesar dos valores expressivos encontrados no presente estudo, ressalta-se a limitação da coleta ter sido realizada em apenas quatro pacientes (duas de cada grupo), o que pode não representar fielmente o comportamento do parâmetro no restante do grupo. As bilirrubinas foram avaliadas em oito pacientes com SG e em duas com SRAG, apresentando-se elevadas em apenas uma paciente (Gráfico 2).

Em relação aos parâmetros para avaliação de coagulação e marcadores de inflamação/infeção utilizados na COVID-19, foram observados resultados conforme demonstrados no Gráfico 3.

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos das pacientes com COVID-19.

	Síndrome gripal			SRAG		
	Diminuído N (%)	Normal N (%)	Elevado N (%)	Diminuído N (%)	Normal N (%)	Elevado N (%)
Hemoglobina (Referência: 12-16 g/dL) ⁽⁶⁾	16 (69,7%)	7 (30,3%)	-	13 (76,4%)	4 (23,6%)	-
Hematócrito (Referência: 36%-45%) ⁽⁶⁾	17 (79,3%)	6 (20,7%)	-	12 (70,6%)	4 (23,6%)	1 (5,8%)
Leucócitos (Referência: 4000-11000 / mm^3) ⁽⁶⁾	-	5 (23,8%)	16 (76,2%)	-	3 (17,7%)	14 (82,3%)
Contagem de plaquetas (Referência: 150.000-450.000/ mm^3) ⁽⁶⁾	9 (39,1%)	13 (56,5%)	1 (4,4%)	6 (35,3%)	9 (52,9%)	2 (11,8%)

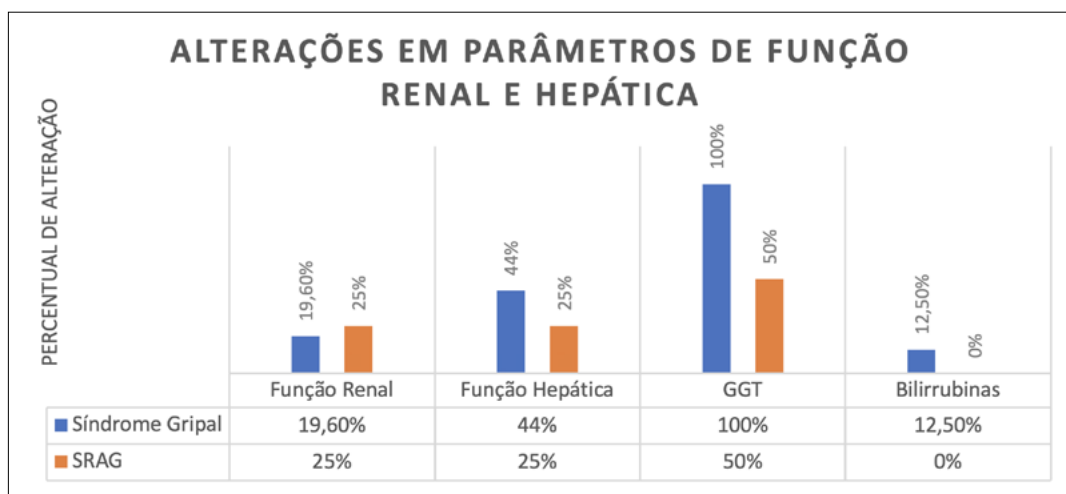


Gráfico 2. Alterações em parâmetros de função renal e hepática nas pacientes avaliadas.

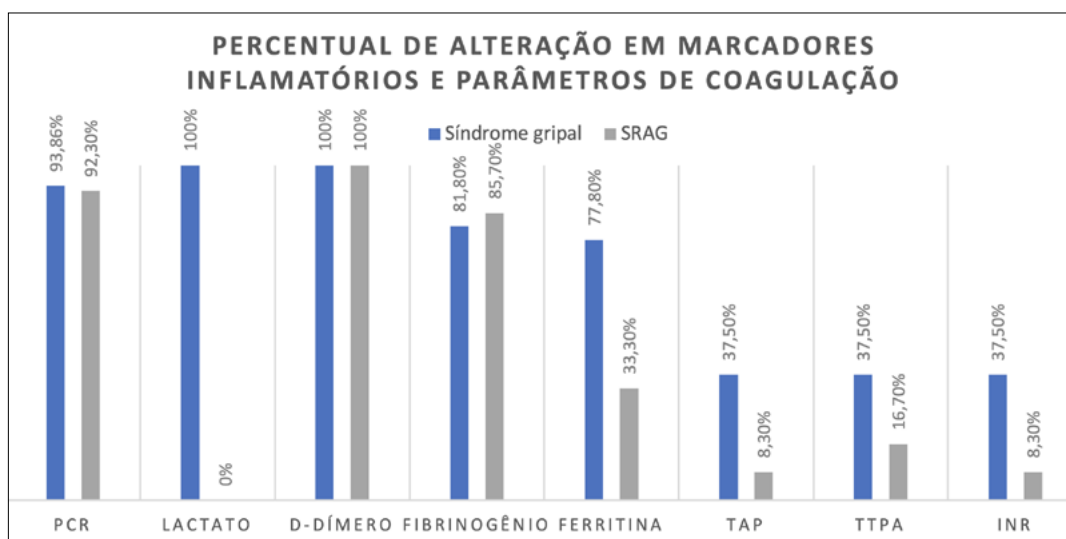


Gráfico 3. Percentual de alteração em marcadores inflamatórios e parâmetros de coagulação.

A proteína C reativa (valor de referência: 0 a 0,5 mg/dL),⁽⁶⁾ considerada importante marcador de fase aguda, apresentou-se elevada na maioria das pacientes nos dois grupos analisados, ratificando a importância de sua análise em detrimento da pouca especificidade. A análise do lactato, realizada mediante dosagem sérica e em gasometrias arteriais, representa importante instrumento para análise da perfusão tecidual de oxigênio, tendo sido realizada em duas pacientes de cada grupo e alterada apenas naquelas com diagnóstico de síndrome gripal.

Os coagulogramas das pacientes avaliadas apresentaram poucas e divergentes alterações, com redução da atividade do tempo de atividade de protrombina (TAP), ou seja, menor que 70%)⁽⁶⁾ em 37,5% das mulheres com SG e 8,3% na SRAG. O tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

e INR (referência: menor ou igual a 1,2)⁽⁶⁾ estiveram alterados em 37,5% no grupo classificado com SG; enquanto na SRAG, 16,07% e 8,03% apresentaram elevação de TTPA (valor de referência: menor ou igual a 1,3)⁽⁶⁾ e INR, respectivamente.

No grupo com SG, o fibrinogênio (valor de referência: 180-350 mg/dL)⁽⁶⁾ foi avaliado em 11 pacientes, revelando-se elevado em 81,8% dessas. A dosagem de ferritina (valor de referência: 9-148 ng/mL)⁽⁶⁾ foi solicitada para nove pacientes, com aumento em 77,8% dessa população. Para as mulheres com SRAG, o fibrinogênio foi avaliado em sete pacientes, estando elevado em 85,7% delas; a dosagem de ferritina foi solicitada para seis pacientes, com aumento em 33,3% dessa população.

O dímero-D ou D-dímero, uma das grandes apostas dos pesquisadores para avaliação de prognóstico da

doença e coagulação intravascular disseminada (CID), foi o parâmetro com alteração mais uniforme entre os grupos, alterado ($>0,5$ ug/mL) em 100% das pacientes avaliadas (sete de cada grupo).

Percebeu-se pouca alteração, em comparação aos valores de referência, nos níveis séricos de sódio, potássio, magnésio, cálcio e fósforo, ocorrendo apenas uma pequena incidência de episódios de hipocalcemia e hiponatremia. Uma limitação na análise dos eletrólitos foi a solicitação desse exame em uma pequena parcela das pacientes avaliadas.

Outros parâmetros avaliados nas pacientes internadas com SG e SRAG foram a lactato desidrogenase (LDH) e creatinofosquinase (CPK), conforme demonstrado na Tabela 2. A CPK é útil para ajudar no diagnóstico de doenças como infarto, insuficiência renal ou pulmonar, dentre outras. Em associação com a LDH e troponina auxilia na triagem de problemas cardíacos ou de alterações hepáticas, sendo também solicitada a dosagem de TGO/ AST (Transaminase

Oxalacética/ Aspartato Aminotransferase), TGP/ ALT (Transaminase Glutâmico Pirúvica/ Alanina Aminotransferase) e GGT (gama-glutamilttransferase).

Devido à importância clínica e incidência no grupo de gestantes, alguns dados foram cruzados com o diagnóstico de síndrome HELLP, que pode representar importante fator confundidor na análise das alterações laboratoriais atribuídas à COVID-19. Esta síndrome representa uma das formas graves dos transtornos hipertensivos gestacionais, sendo um acrônimo para os critérios estabelecidos para sua presença: hemólise (*hemolysis*), elevação das enzimas hepáticas (*elevated liver enzymes*) e plaquetopenia (*low platelets*).

Como demonstrado na Figura 1, grande parte das alterações relacionadas à hemólise, a dano hepático e à plaquetopenia, condições observadas nas pacientes com SG, cursou com o diagnóstico de síndrome HELLP, inviabilizando a associação dessas alterações unicamente ao SARS-CoV-2 (Figura 2).

Tabela 2 - Valores de CPK e LDH das pacientes com COVID-19.

	Síndrome gripal			SRAG		
	Diminuído N (%)	Normal N (%)	Elevado N (%)	Diminuído N (%)	Normal N (%)	Elevado N (%)
CPK (Referência: < 170 mg/dL) ⁽⁶⁾	-	6 (75%)	2 (25%)	-	2 (33,3%)	4 (66,7%)
LDH (Referência: 230-460 U/L) ⁽⁶⁾	-	4 (30,8%)	9 (69,2%)	-	2 (25%)	6 (75%)

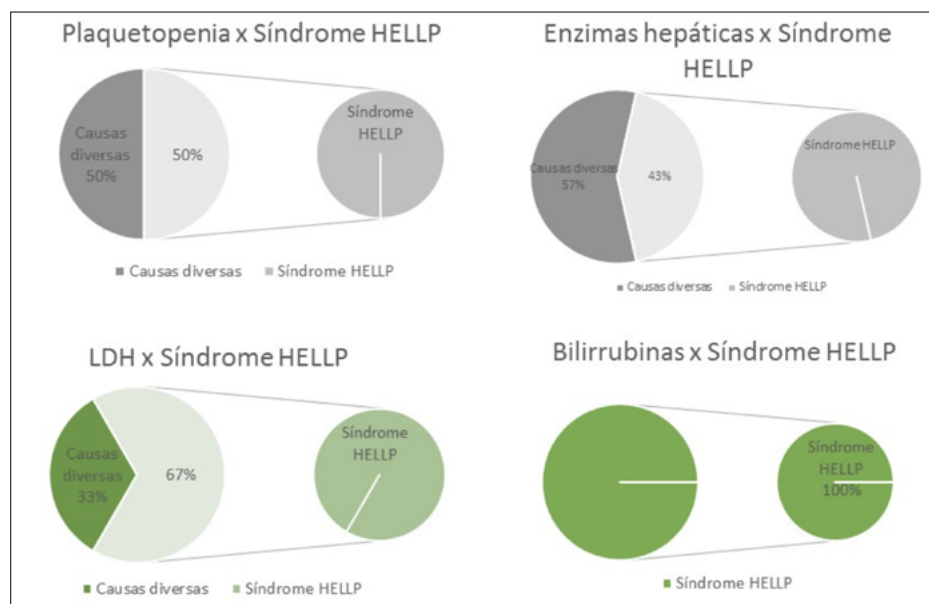


Figura 1. Alterações laboratoriais versus síndrome HELLP em pacientes com SG.

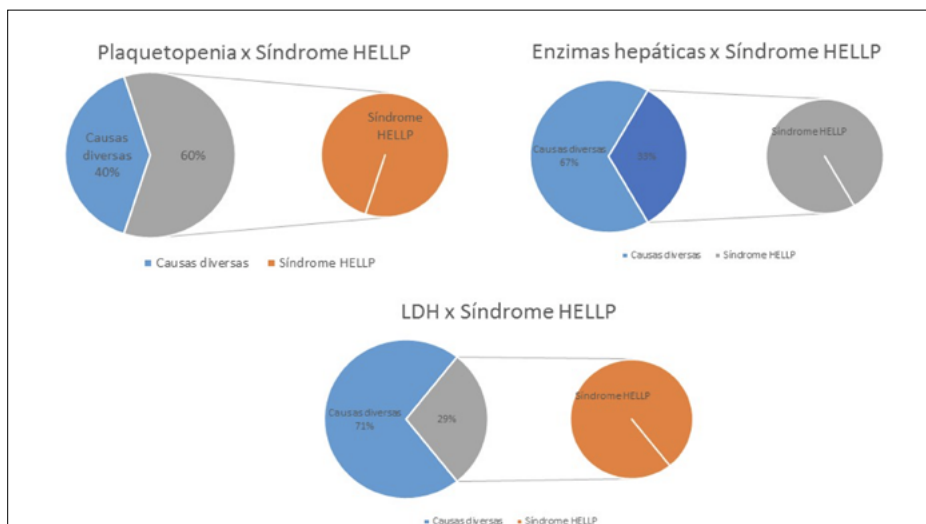


Figura 2. Alterações laboratoriais versus síndrome HELLP em pacientes com SRAG.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido em uma população com parâmetros laboratoriais sensibilizados pelo processo de gestação, parto e puerpério. Como descrito nos resultados hematológicos, os dois grupos de pacientes apresentaram notória redução de hemoglobina e hematócrito, fenômeno já descrito na literatura a partir do segundo trimestre da gestação, portanto, não podem ser interpretados somente sob a ótica da COVID-19.⁽⁷⁾

O achado de linfopenia nos dois grupos estudados corrobora com o estudo de Huang *et al.*,⁽¹⁾ no qual foram encontradas contagens baixas de linfócitos e leucócitos na maioria dos pacientes. No entanto, em nossos resultados, evidenciou-se a leucocitose com aumento de neutrófilos nas mulheres avaliadas. GAO *et al.*⁽⁵⁾ sugeriram, a partir dessa observação, que o SARS-CoV-2 pode atuar principalmente nos linfócitos, especialmente os linfócitos T, assim como o SARS-CoV. Alguns estudos sugerem que os danos aos linfócitos T podem ser um fator importante que leva às reações exacerbadas dos pacientes acometidos pela COVID-19.⁽⁸⁾

A trombocitopenia (redução do número de plaquetas) foi evidenciada em mais de 35% das pacientes nos dois grupos, sendo um importante indicador para avaliar o aumento do risco de doença grave e mortalidade em pacientes com COVID-19 e, portanto, deve servir como indicador clínico de agravamento da doença durante a hospitalização.⁽⁹⁾ Entretanto, é importante ressaltar que, em nossos resultados, a plaquetopenia cursou, em mais de 50% das pacientes, com o diagnóstico de síndrome HELLP – síndrome hipertensiva da gestação que apresenta trombocitopenia entre seus achados laboratoriais.

Entre os marcadores de inflamação/infecção utilizados na COVID-19 e avaliação do coagulograma, a PCR, D-dímero e fibrinogênio apresentaram notório aumento entre as pacientes infectadas, mostrando-se como parâmetros de grande relevância na COVID-19. Wang *et al.* (2020) encontraram níveis mais elevados de D-dímero no grupo de pacientes internados em UTI, enquanto no presente estudo 100% das pacientes dos dois grupos apresentaram aumento do marcador.

As alterações de enzimas hepáticas mais evidenciadas no grupo com SG vão de encontro ao que Huang *et al.*⁽¹⁾ relataram em seu estudo, com maiores variações no grupo de pacientes submetidas a cuidados em unidades de terapia intensiva (UTI).

O aumento de CPK e LDH mais evidenciado no grupo de pacientes com SRAG corrobora com achado de Wang *et al.*,⁽¹⁰⁾ no qual as pacientes em cuidados intensivos apresentaram valores mais elevados dos dois parâmetros, em comparação aos pacientes em enfermarias.

Em relação aos achados inespecíficos sobre os eletrólitos, ratifica-se o que já fora demonstrado em outros estudos, nos quais não houve representação estatística ou clinicamente significativa de alterações nas concentrações de sódio ou potássio nos pacientes com COVID-19 em estado grave/fatal em comparação aos casos leves.⁽¹¹⁾

Uma grande limitação do estudo é a ausência de mensuração da procalcitonina, importante sinalizadora de processos infecciosos bacterianos, permitindo maior acurácia no diagnóstico e uso racional de antimicrobianos, quando devidamente evidenciada a presença de infecção.

A presença concomitante de condições obstétricas e puerperais específicas pode representar importante fator

confundidor na análise dos exames, uma vez que as alterações podem ter sido causadas pela síndrome HELLP, cascata da coagulação ativada após o parto, entre outros.

Outras limitações encontradas no estudo foram: a falta de reagente para dosagem de D-dímero em algumas pacientes, a discrepância de solicitação de exames entre enfermarias e unidades de terapia intensiva (nesses coletados diariamente), a ausência de solicitação exames para avaliação bioquímica completa das pacientes analisadas.

CONCLUSÃO

Durante o período de março a outubro, foram notificadas no Núcleo de Vigilância Epidemiológica (NUVE) da instituição 43 pacientes com diagnóstico confirmatório por teste rápido com IgM e *swab* nasofaríngeo com detecção de SARS-CoV-2. Em relação às características dessa população, a faixa etária média do grupo com SG foi de 27,8 anos e 24,7 para SRAG.

Na estratificação por grupos, 26 (60%) das pacientes apresentaram SG e 17 (40%), SRAG. Três pacientes foram excluídas da análise dos exames laboratoriais por não apresentarem nenhum registro de exame na instituição durante o período de internação. No grupo de SRAG ocorreram dois óbitos, representando 5% da amostra total de pacientes.

As alterações laboratoriais que apresentaram maior evidência na amostra estudada foram a diminuição de parâmetros do eritrograma (hemoglobina e hematócrito), plaquetopenia e leucocitose (com neutrofilia) no leucograma. Outros marcadores que demonstraram notórias variações foram PCR, D-dímero e fibrinogênio, os quais já foram bem descritos em literatura como importantes sinalizadores da gravidade e prognóstico da COVID-19.

Ressalta-se a importância da realização de novos estudos com enfoque na população gestante e puérpera, pois as consequências da doença nessa população podem afetar diretamente o binômio mãe-bebê. Além disso, através do domínio e conhecimento das alterações laboratoriais, pode-se avaliar e atuar previamente na elaboração de um desfecho favorável para essa mulher e seu filho.

Abstract

Objective: To analyze the changes in laboratory tests of pregnant women and postpartum women with a laboratory diagnosis of COVID-19 attended at a reference maternity hospital in Fortaleza / Ceará, from March to October 2020. **Methods:** This is a retrospective, descriptive study, with a quantitative approach, involving the analysis of data from laboratory tests of patients with a confirmatory diagnosis for COVID-19 in the period from March to October 2020. The data were collected from the results of tests obtained in the institutional platforms as well as data review and evolution physical and electronic medical records. **Results:** The patients showed a marked reduction in hemoglobin and hematocrit, leukocytosis with lymphopenia and alteration of biochemical

parameters of liver function. In the sample studied, a percentage of deaths of 5% was obtained. In addition, changes in inflammation and coagulation markers were evidenced, data that corroborate with studies in the area. **Conclusion:** Specific changes in COVID-19 were detected in the two groups of patients, emphasizing the importance of conducting further studies focusing on the pregnant and postpartum population, as the consequences of the disease in this population can be applied directly in the mother-child binomial.

Keywords

Coronavirus Infections; Pregnant Women; Laboratorial Test

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Coronavírus: o que você precisa saber e como prevenir o contágio. BRASIL, 2020. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/coronavirus>. Acesso em 25 jul. 2020.
2. Huang C et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223):497-506.
3. Kampf G et al. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect* [Internet]. 2020.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Coordenação-Geral de Ciclos da Vida. Coordenação da Saúde da Mulher. Nota Técnica Nº 12/2020-COSMU/CGCIVI/DAPES/SAPS/M. Infecção COVID-19 e os riscos às mulheres no ciclo gravídico-puerperal: BRASIL, 2020a.
5. Gao Y, Li T, Han M et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *J Med Virol*. 2020;92(7): 791-6.
6. Rosenfeld Luiz Gastão, Malta Deborah Carvalho, Szwarcwald Célia Landmann, Bacal Nydia Strachman, Cuder Maria Alice Martins, Pereira Cimar Azeredo et al. Valores de referência para exames laboratoriais de hemograma da população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde. *Rev. Bras. Epidemiol.* [Internet]. 2019 [cited 2020 Dec 29]; 22(Supl 2): E190003.SUPL.2. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2019000300413&lng=en. Epub Oct 07,2019. <https://doi.org/10.1590/1980-549720190003.supl.2>.
7. Lurie S, Mamet Y. Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000; 93(2):185-92.
8. De Wit E, Van Doremalen, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14(8):523-34.
9. Giuseppe L, Mario P, Brandon MH. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*, 2020; 506:145-8.
10. Wang D, HU B, HU C et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020; 323(11): 1061-9.
11. Skevaki C, Fragkou PC, Cheng C, Xie M, Renz H. Laboratory characteristics of patients infected with the novel SARS-CoV-2 virus. *J Infect* 2020;81:205-12.

Correspondência

Jéssica Sales Araújo de Albuquerque

Maternidade Escola Assis Chateaubriand,

Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, S/N, Fortaleza-CE, Brasil.

E-mail: jessyaraújo@gmail.com

Acurácia diagnóstica dos métodos sorológicos de detecção da COVID-19

Diagnostic accuracy of serological methods for detecting COVID-19

Flávia Martinello¹

Resumo

A rápida caracterização do genoma do Coronavírus-2 (SARS-CoV-2) mobilizou a produção em larga escala de métodos diagnósticos. Agências reguladoras aprovaram condicionalmente o uso emergencial de vários deles. Na emergência de saúde, inúmeros exames foram utilizados sem o devido conhecimento da qualidade. O objetivo desta revisão narrativa foi destacar a acurácia diagnóstica dos métodos sorológicos de diagnóstico da COVID-19 em termos de sensibilidade e especificidade clínicas. A sensibilidade diagnóstica variou até 50% entre estudos, enquanto a especificidade apresentou menor variação; no entanto, uma mesma marca chegou a apresentar variação de 32%. Considerando-se o critério de especificidade >95% definido pelo FDA, apenas uma marca de ensaio para detecção de IgG e outra para IgM atingiram a meta. Para a detecção de IgA e de IgA+IgM, as únicas marcas apresentadas não atingiram a meta. Entre as cinco marcas para detecção de IgM+IgG, apenas uma não atingiu a especificidade clínica. Para Ig total, as duas marcas apresentaram especificidade aceitável. Considerando-se o critério de sensibilidade clínica >90%, apenas 6 dos 25 estudos com diferentes marcas de ensaios para detecção de IgG apresentam o desempenho especificado; destas, nenhuma é brasileira. Nenhuma das marcas de ensaios para detecção de IgM e IgM+IgG apresentaram o desempenho especificado. A única marca apresentada para detecção de IgA+IgM atingiu a meta especificada pelo FDA. Os ensaios imunocromatográficos apresentaram menor sensibilidade. Os resultados demonstraram o pobre valor diagnóstico dos imunoenaios, mas com potencial para estudos soropidemiológicos. Mais estudos de validação analítica e acurácia diagnóstica de ensaios são essenciais, principalmente dos reagentes nacionais.

Palavras-chave

Acurácia diagnóstica; COVID-19; IgG; IgM; testes sorológicos; SARS-CoV-2

INTRODUÇÃO

Com a identificação da síndrome respiratória aguda grave (SARS) causada pelo Coronavírus-2 (SARS-CoV-2) em dezembro de 2019 e a rápida caracterização do genoma completo do vírus, a indústria de produtos para diagnóstico *in vitro* se mobilizou rapidamente para a produção em larga escala de métodos diagnósticos.⁽¹⁾ Inicialmente, além dos métodos moleculares para identificação do vírus, foram produzidos exames chamados sorológicos para a identificação de anticorpos das classes IgA, IgM, IgG e totais. Posteriormente, surgiram os imunoenaios para detecção de antígeno (Ag) viral. Estes imunoenaios, principalmente os imunocromatográficos, possibilitaram a testagem em massa na população.⁽¹⁾ No entanto, foram os métodos moleculares desenvolvidos *in house* que garantiram o diagnóstico preciso

em larga escala. Não há registro precedente de aplicação do conhecimento científico tão rápido e eficiente para produção de métodos diagnósticos (*kits*) de forma simultânea ao descobrimento e expansão da doença no planeta.⁽¹⁾

Desde o início da emergência de saúde pública, a Organização Mundial de Saúde (OMS) enfatizou testar quantos indivíduos fosse possível e rastrear pessoas infectadas e seus contatos como estratégia eficaz para reduzir a propagação do vírus.⁽²⁻⁴⁾ Assim, agências regulatórias como a OMS, o FDA (do inglês, Food and Drug Administration) americano e mesmo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no Brasil, aprovaram condicionalmente o uso emergencial de vários novos métodos.^(2,3) Dessa forma, vários tipos de exames disponíveis foram utilizados ainda que sem o devido conhecimento da qualidade dos mesmos.

¹ Docente do Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100966

ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DOS MÉTODOS LABORATORIAIS DIAGNÓSTICOS DA COVID-19

Os ensaios diagnósticos diretos identificam a infecção diretamente ao detectar o RNA ou um antígeno viral, enquanto os indiretos detectam os anticorpos contra o vírus em um indivíduo que foi exposto.⁽⁵⁾ A Figura 1 ilustra os principais métodos laboratoriais para diagnóstico da doença causada pelo SARS-CoV-2, denominada COVID-19, do inglês *coronavirus disease*.

Esses métodos de diagnóstico têm rendimento, eficiência, requisitos de configuração e de infraestrutura, desempenho analítico e tempos de liberação de resultado variáveis. Além de depender do equipamento e do método em si, o resultado laboratorial também depende do protocolo de coleta de amostra, da qualidade dos reagentes usados, do potencial de contaminação cruzada e da forma de armazenamento das amostras e reagentes.⁽⁵⁾ Esses fatores devem ser considerados ao selecionar um método de diagnóstico rápido e confiável para ajudar a tomar uma decisão apropriada e ações de saúde pública imediatas.⁽⁶⁾

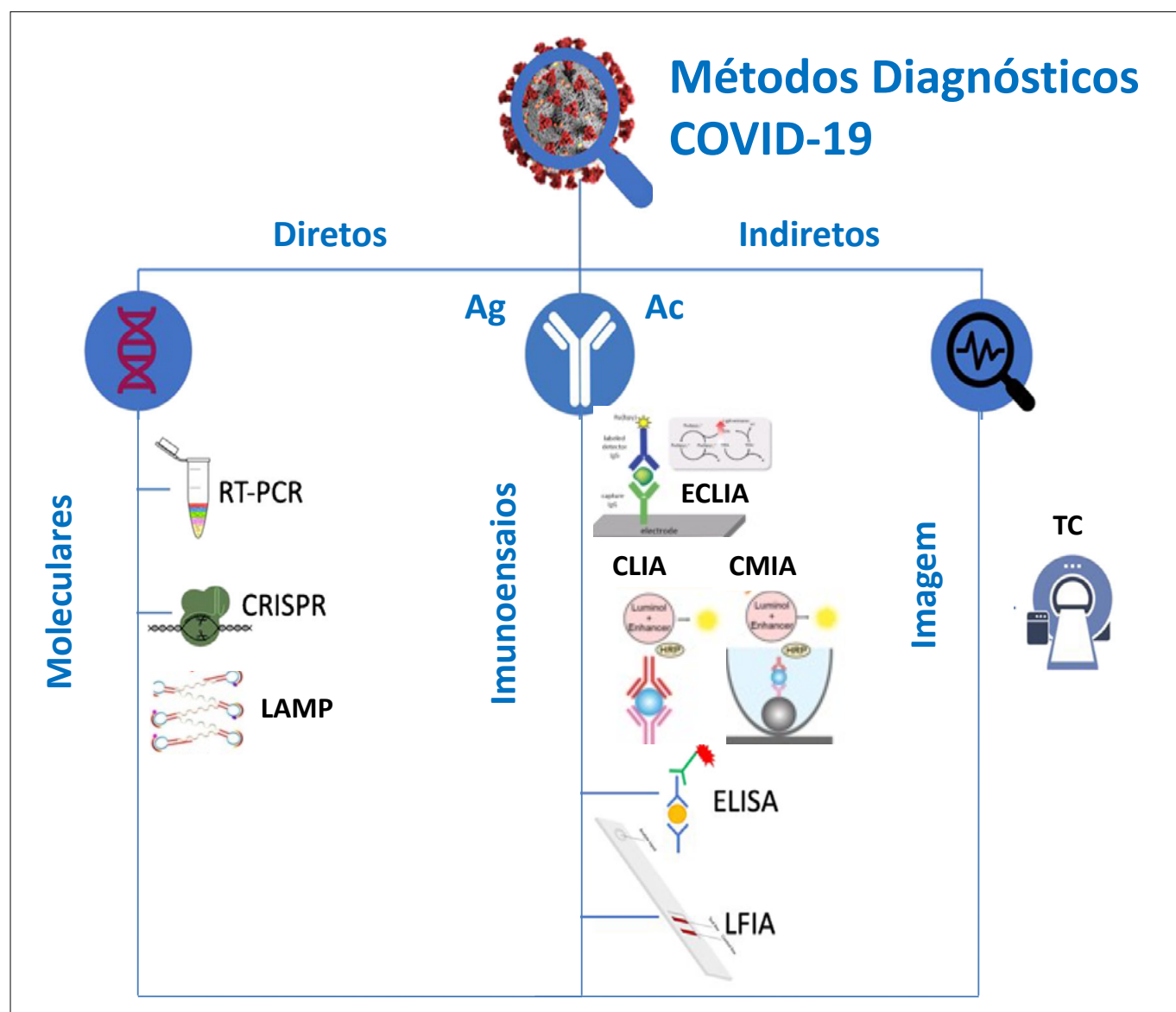


Figura 1. Principais métodos para diagnóstico da COVID-19.

Legenda: RT-PCR, transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real; CRISPR, repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas; LAMP, amplificação isotérmica mediada por alça; ELISA, imunoensaio enzimático; LFIA, imunoensaio de fluxo lateral; CLIA, imunoensaio de quimiluminescência; CMIA, imunoensaio de micropartículas de quimiluminescência; ECLIA, imunoensaio de eletroquimiluminescência; Ag, antígeno; Ac, anticorpo; TC, tomografia computadorizada.

Fonte: Adaptado de GIRI et al, 2021.⁽⁶⁾

Poucos estudos têm apresentado dados de desempenho analítico de testes moleculares ou imunoenaios quantitativos como precisão intra e interensaio, exatidão, limite de detecção, avaliação de interferentes, linearidade, sensibilidade analítica, etc.^(1,4) Assim, não está claro para os laboratórios quais ensaios apresentam melhor desempenho e se os resultados desses diferentes ensaios são comparáveis.⁽⁷⁾

Com a utilização em larga escala dos métodos sorológicos qualitativos, na rotina laboratorial, as validações dos mesmos têm se limitado à análise da sensibilidade e especificidade clínicas.

A sensibilidade analítica compreende a concentração do analito que causa uma variação no valor do sinal analítico medido. Quanto mais sensível um método, menor é a concentração do analito capaz de gerar um sinal no sistema de detecção do método.⁽⁸⁾ Contudo, o termo sensibilidade analítica tem sido utilizado, de forma equivocada, como sinônimo de limite de detecção (LD), que é o menor valor detectável do teste, significativamente diferente de zero, e depende da amplitude da leitura do branco e da precisão desta medida.^(1,4,9) A especificidade analítica, por sua vez, é a capacidade de um método analítico de medir apenas o analito procurado.⁽⁸⁾

Por outro lado, a sensibilidade clínica ou sensibilidade diagnóstica define quão frequentemente um resultado é positivo quando uma doença em particular está presente. Normalmente é expressa como percentual de indivíduos com uma doença que tem o resultado positivo. A especificidade clínica, por sua vez, é quão frequentemente um resultado é negativo na ausência de uma doença em particular. Normalmente é expressa como percentual de indivíduos sem uma doença que tem o resultado positivo.⁽⁸⁾

Os exames laboratoriais desempenham papel fundamental no diagnóstico e tratamento da COVID-19. Um método diagnóstico deve ter sensibilidade e especificidade suficientes para tomar decisões clínicas apropriadas rapidamente.^(1,5) Nesse contexto, o objetivo desta revisão narrativa foi destacar a acurácia diagnóstica dos métodos sorológicos de diagnóstico da COVID-19 em termos de sensibilidade e especificidade clínicas, e sob essa perspectiva discutir a influência das limitações dos métodos no controle da pandemia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há vários estudos apresentando a acurácia clínica de ensaios sorológicos, possivelmente por ser o tipo de ensaio mais produzido. Entre as dezenas de marcas de reagentes disponíveis no mercado, buscamos apresentar o desempenho daquelas conhecidas internacionalmente e utilizadas no Brasil, e também dos kits produzidos no Brasil, ainda que haja poucos estudos sobre estes últimos.

A Tabela 1 sumariza os achados e apresenta os dados de 14 marcas de reagentes. Destas, algumas analisam anticorpos totais (2), IgA (1), IgM (7), IgG (12), IgM+IgG

(6), e IgA+IgM (1). Cinco métodos são utilizados pelas diferentes marcas, LFIA – imunoensaio de fluxo lateral ou imunocromatográfico (5), ELISA – imunoensaio enzimático (4), CLIA – imunoensaio de quimiluminescência (3), CMIA – imunoensaio de micropartículas de quimiluminescência (1), e ECLIA imunoensaio de eletroquimiluminescência (1). Para um mesmo ensaio foram encontrados de um a quatro estudos. Os sete estudos foram realizados em seis países, sendo dois no Brasil. Assim, como observado por Mark et al.,⁽⁹⁾ foi possível verificar que a acurácia diagnóstica varia entre estudos e entre as marcas de reagentes. A especificidade diagnóstica apresentou menor variação entre os estudos, no entanto, uma mesma marca chegou a apresentar 32% de diferença de especificidade. A sensibilidade diagnóstica dos ensaios foi analisada, em amostras coletadas, em média, 14 dias após o início dos sintomas, que representa um período com maior sensibilidade. A sensibilidade dos reagentes variou até 50% entre estudos. Contudo, cabe destacar que algumas marcas dispõem de apenas um estudo de avaliação da acurácia diagnóstica (Tabela 1).

Considerando-se o critério de especificidade >95% definido pelo FDA para autorização de uso emergencial,⁽¹⁰⁾ entre os ensaios em que foi descrita a especificidade, apenas uma marca (Viracell) de ensaio para detecção IgG não atingiu essa meta em dois estudos. Para a detecção de IgM, apenas uma marca com um único estudo não atingiu a meta (Mbiolog Diagnósticos). Para a detecção de IgA, a única marca apresentada (Euroimmun) não atingiu a especificidade clínica mínima proposta pelo FDA em quatro estudos diferentes. Para a detecção de IgA+IgM, a única marca apresentada (Viracell) não atingiu a especificidade clínica mínima proposta pelo FDA em dois estudos diferentes. Entre as cinco marcas que produzem kits para detecção de IgM+IgG, apenas uma marca (Biomanguinhos) não atingiu a especificidade clínica. Para Ig totais, as duas marcas apresentaram especificidade aceitável em diferentes estudos (Tabela 1).

Considerando o critério de sensibilidade clínica >90%, a maioria dos ensaios não atingiu a meta especificada pelo FDA para autorização de uso emergencial.⁽¹⁰⁾ Apenas 6 (24%) dos 25 estudos com as 12 diferentes marcas de ensaios para detecção de IgG apresentam o desempenho especificado, destas nenhuma é brasileira. Nenhum dos nove estudos com sete diferentes marcas de ensaios para detecção de IgM apresentaram o desempenho especificado, incluindo as cinco marcas brasileiras. Da mesma forma, nenhum dos seis estudos com cinco diferentes marcas de ensaios para detecção de IgM+IgG apresentam o desempenho especificado, incluindo as cinco marcas brasileiras. Da única marca apresentada com ensaio para detecção de IgA (Euroimmun), apenas um dos quatro estudos indicou sensibilidade >90%. Por outro lado, a única marca apresentada (Viracell) para detecção de IgA+IgM atinge a meta especificada pelo FDA nos dois estudos (Tabela 1).

Tabela 1 - Sensibilidade e especificidade diagnósticas segundo o ensaio, o fabricante, o método, o número de amostras testadas na pesquisa, o período da coleta de amostra, o país e a referência do estudo.

Teste	Fabricante	Método	Sensibilidade clínica (%)	Especificidade clínica (%)	Nº de amostras testadas	Nº de dias após o início dos sintomas	(Referência) País do estudo
IgG	Abbott (Architect) - EUA	CMIA	79,2	99,3	433	>14	(25) EUA
IgG	Abbott (Architect) - EUA	CMIA	95,2	-	21	16-20	(26) França
IgG	Abbott (Architect) - EUA	CMIA	84,7	99,5	2970	>14	(27) Israel
IgG	Abbott (Architect) - EUA	CMIA	96	100	76	>10	(22) Croácia
IgG	Beckman (Accsess) - EUA	CLIA	58,3	99,8	424	>14	(25) EUA
IgG	Beckman (Accsess) - EUA	CLIA	81,5	100	480	>14	(27) Israel
IgG	Diasorin (Liaison S1/S2) - EUA	CLIA	54,2	98,4	433	>14	(25) EUA
IgG	Diasorin (Liaison S1/S2) - EUA	CLIA	71,4	-	21	16-20	(26) França
IgG	Diasorin (Liaison S1/S2) - EUA	CLIA	82,4	98,7	2941	>14	(27) Israel
IgG	Euroimmun - Alemanha	ELISA	50,0	97,5	433	>14	(25) EUA
IgG	Euroimmun - Alemanha	ELISA	87,2	95,8	47	>14	(14) Brasil
IgG	Euroimmun - Alemanha	ELISA	100	93	76	>10	(22) Croácia
IgG	Euroimmun - Alemanha	ELISA	88,2	100	28	>10	(16) Brasil
IgG	Vircell Microbiologists - Espanha	ELISA	93,2	53,4	74	>14	(14) Brasil
IgG	Vircell Microbiologists - Espanha	ELISA	96	85	72	>10	(22) Croácia
IgG	Snibe (MAGLUMI™ 2000 Plus) - China	CLIA	88,0	-	25	>13	(4) Itália
IgG	Snibe (MAGLUMI™ 2000 Plus) - China	CLIA	93	100	76	>10	(22) Croácia
IgG	Snibe (MAGLUMI™ 2000 Plus) - China	CLIA	87,5	96,0	90	>15	(16) Brasil
IgG	Biotech (One Step) - China	LFIA	68,9	-	74	>14	(14) Brasil
IgG	Biomanguinhos - Brasil	LFIA	78,4	-	74	>14	(14) Brasil
IgG	ECO teste - Brasil	LFIA	87,8	-	74	>14	(14) Brasil
IgG	Gold Analisa - Brasil	LFIA	74,3	-	74	>14	(14) Brasil
IgG	MbiologDiagnósticos (Allserum) - Brasil	ELISA	78,9	98,1	71	>14	(14) Brasil
IgG	Wama (Imunorápido) - Brasil	LFIA	83,8	-	74	>14	(14) Brasil
IgG	Wama (Imunorápido) - Brasil	LFIA	72,2	100	28	>15	(16) Brasil
IgM	Snibe (MAGLUMI™ 2000 Plus) - China	CLIA	56	100	76	>10	(22) Croácia
IgM	Snibe (MAGLUMI™ 2000 Plus) - China	CLIA	88,0	-	25	>13	(4) Itália
IgM	Biotech (One Step) - China	LFIA	28,4	-	74	>14	(14) Brasil
IgM	Biomanguinhos - Brasil	LFIA	62,2	-	74	>14	(14) Brasil
IgM	ECO teste - Brasil	LFIA	82,4	-	74	>14	(14) Brasil
IgM	Gold Analisa - Brasil	LFIA	12,2	-	74	>14	(14) Brasil
IgM	MbiologDiagnósticos (Allserum) - Brasil	ELISA	50,7	70,4	71	>14	(14) Brasil
IgM	Wama (Imunorápido) - Brasil	LFIA	44,6	-	74	>14	(14) Brasil
IgM	Wama (Imunorápido) - Brasil	LFIA	55,6	100	28	15 a 21 dias	(16) Brasil
Ig Total	Bio-Rad (Platelia) - EUA	ELISA	83,3	99,3	433	>14	(25) EUA
Ig Total	Bio-Rad (Platelia) - EUA	ELISA	90,5	-	76	16-20	(26) França
Ig Total	Roche (Elecsys) - EUA	ECLIA	79,2	99,8	433	>14	(25) EUA
Ig Total	Roche (Elecsys) - EUA	ECLIA	85,7	-	21	16-20	(26) França
Ig Total	Roche (Elecsys) - EUA	ECLIA	89,0	100	2005	>14	(27) Israel
Ig Total	Roche (Elecsys) - EUA	ECLIA	96	100	76	>10	(22) Croácia

(continua)

Tabela 1 - Sensibilidade e especificidade diagnósticas segundo o ensaio, o fabricante, o método, o número de amostras testadas na pesquisa, o período da coleta de amostra, o país e a referência do estudo. (continuação)

Teste	Fabricante	Método	Sensibilidade clínica (%)	Especificidade clínica (%)	Nº de amostras testadas	Nº de dias após o início dos sintomas	(Referência) País do estudo
IgM+IgG	Biotech (One Step) - China	LFIA	83,7	100	74		(14) Brasil
IgM+IgG	Biotech (One Step) - China	LFIA	68,9	100	74	>14	(14) Brasil
IgM+IgG	Biomanguinhos - Brasil	LFIA	82,4	81,0	74	>14	(14) Brasil
IgM+IgG	ECO teste - Brasil	LFIA	89,2	99,1	74	>14	(14) Brasil
IgM+IgG	Gold Analisa - Brasil	LFIA	74,3	98,3	74	>14	(14) Brasil
IgM+IgG	Wama (Imunorápido) – Brasil	LFIA	86,5	97,4	74	>14	(14) Brasil
IgA+IgM	Vircell Microbiologists - Espanha	ELISA	95,9	23,3	74	>14	(14) Brasil
IgA+IgM	Vircell Microbiologists - Espanha	ELISA	100	70	73	>10	(22) Croácia
IgA	Euroimmun - Alemanha	ELISA	70,8	79,9	433	>14	(25) EUA
IgA	Euroimmun - Alemanha	ELISA	89,4	82,2	47	>14	(14) Brasil
IgA	Euroimmun - Alemanha	ELISA	96,0	90	76	>10	(22) Croácia
IgA	Euroimmun - Alemanha	ELISA	88,0	90,0	106	>15	(16) Brasil

LFIA: imunoenensaio de fluxo lateral (imunocromatográfico), CLIA: imunoenensaio de quimiluminescência, CMIA: imunoenensaio de micropartículas de quimiluminescência, ECLIA: imunoenensaio de eletroquimiluminescência, -: Não informado.

Contudo, diversas revisões sistemáticas e meta-análises da acurácia diagnóstica dos ensaios sorológicos para COVID-19 destacam alto risco de falhas nos estudos em relação à seleção de pacientes/amostras, interpretação dos resultados dos ensaios e da performance dos mesmos.^(11,12) Além disso, vários estudos consideram amostras positivas baseando-se em apenas um resultado de RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real), ignorando o potencial de resultados falsos negativos também deste método.⁽¹¹⁾ Estas revisões têm demonstrado uma especificidade total de 96,6% a 98% para os imunoenaios e sensibilidade variável de acordo com o método, tipo de anticorpo pesquisado, tempo de coleta após início dos sintomas,^(1,11,12) tipo de amostra, e do limite de detecção dos métodos.⁽¹⁾ De forma semelhante ao que observamos, alguns estudos também concluíram que, em geral, os ensaios imunocromatográficos (LFIA) apresentaram menor sensibilidade.^(11,12)

Castro et al. analisaram a acurácia diagnóstica informada pelos fabricantes dos ensaios comerciais registrados no Brasil em 2020.⁽¹³⁾ Os autores observaram que, segundo os dados dos fabricantes, a sensibilidade dos ensaios para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 da classe IgM varia de 55% a 90%, portanto, tendo sido autorizada a comercialização de reagentes que podem apresentar taxa de resultados falsos negativos de 44%.⁽¹³⁾ Este dado foi confirmado no estudo de Cota et al., que encontraram sensibilidade de 52% para o mesmo ensaio (Biomanguinhos). Outros dois ensaios (Biotech-OneStep e ECO teste) apresentaram desempenho no estudo de Cota et al. inferior ao especificado pelos fabricantes.⁽¹⁴⁾

No Brasil, 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. O instituto tem verificado que aproximadamente 39% dos reagentes, incluindo todos os tipos de testes, têm se mostrado em não conformidade em relação às informações declaradas pelos fabricantes na instrução de uso, normalmente com sensibilidade e/ou especificidades divergentes.⁽¹⁵⁾

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas assim como outras sociedades científicas também se uniu para avaliar kits de diagnóstico para SARS-CoV-2 disponíveis no mercado brasileiro. Ainda, no momento dessa pesquisa, os resultados dos kits da Roche (Elecsys), da Biotech e da Eco estavam, a pedido das empresas, em revisão pelo comitê gestor da parceria.⁽¹⁶⁾

Os resultados apresentados nesta revisão, assim como os resultados de Controle Externo da Qualidade disponíveis,⁽¹⁷⁾ podem contribuir na escolha do método e marca a serem adquiridos por um laboratório. A falta de consenso ou a baixa reprodutibilidade dentro de uma mesma marca de reagente também pode estar relacionada à realização das análises de forma diferente do preconizado pelo fabricante. A observação de tamanha variação de resultados entre estudos reforça a necessidade de validação ou verificação dos métodos antes da sua implantação na rotina laboratorial.

Padoan et al. relataram que a validação dos métodos representa um pré-requisito dos ensaios laboratoriais no diagnóstico e monitoramento dos pacientes com COVID-19. Os autores relataram que poucos ensaios têm sido completamente validados pelos laboratórios, porque esse

processo demanda tempo.⁽⁴⁾ Com grande dificuldade, devido à ausência de amostras controle no início da pandemia, os laboratórios necessitaram realizar validações, na mesma velocidade da expansão da COVID-19, para atender com segurança à crescente demanda pelos testes diagnósticos. Nesse contexto, certamente foram realizados exames laboratoriais sem a devida validação, e, consequentemente, a menor qualidade dos resultados pode ter contribuído para o diagnóstico incorreto ou não isolamento de pacientes com suspeita de COVID-19 e disseminação do vírus na sociedade.

A OMS não recomenda o uso de testes laboratoriais remotos baseados em anticorpos na tomada de decisão clínica.^(6,18) Contudo, dois estudos mostraram menor sensibilidade clínica da RT-PCR, em relação à tomografia computadorizada e aos ensaios sorológicos, para detectar a COVID-19 em pacientes altamente suspeitos.^(19,20)

Em estudos clínicos, outros fatores ainda podem afetar os resultados. Foram relatadas possíveis interferências nos imunoenaios por *Candida albicans*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Rhinovirus*, *Adenovirus*, *Enterovirus*, Vírus *Parainfluenza* e *Influenza*.⁽²¹⁾ Reações cruzadas com imunoenaios para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 foram observadas em amostras expressando IgG para vírus Epstein-Barr, IgG para Citomegalovírus, IgG para Varicella zoster, e anticorpos anti-HBS.⁽²²⁾ Reações cruzadas também podem ser causadas por algumas substâncias presentes no nariz dos pacientes como os descongestionantes fenilefrina, oximetazolina e gel nasal de cloreto de sódio, antifúngico fluconazol, pastilhas para dor de garganta contendo benzocaína e mentol, antiviral oseltamivir (Tamiflu), antibióticos em pomada nasal como mupirocina e tobramicina, e o anti-inflamatório propionato de fluticasona.⁽²¹⁾

Nesse contexto, percebe-se que ainda há um longo caminho para os fabricantes de ensaios sorológicos buscarem conjuntos diagnósticos mais sensíveis e específicos para o SARS-CoV-2. Assim como foi observado no diagnóstico sorológico do vírus da imunodeficiência humana (HIV), várias gerações de ensaios foram produzidas até que chegassemos ao desempenho atual dos reagentes que se tornaram muito mais sensíveis e específicos, e ainda assim o diagnóstico é realizado por pelo menos dois testes. Uma nova geração de testes sorológicos para o SARS-CoV-2, que utilizam uma glicoproteína *Spike* trimérica recombinante como antígeno de captura, já está disponível.⁽²³⁾ No entanto, ainda não há estudos científicos comparando as acurácias clínicas em uma mesma população.

A garantia de qualidade e o suporte regulatório em torno dos testes continuam sendo um desafio. Há vários exemplos de *kits* de diagnóstico de COVID-19 sendo retirados do mercado em vários países devido à falta de qualidade. A falta de um padrão de referência estabelecido, o uso de diferentes amostras, o preparo de amostras e a compreensão incompleta da dinâmica viral ao longo do tempo da infecção dificultam a avaliação rigorosa da precisão do diagnóstico dos muitos ensaios introduzidos para COVID-19,⁽⁶⁾ que são considerados ainda recentes.

Uma ampla variedade de exames laboratoriais para diagnóstico da COVID-19 de diferentes fabricantes está entrando no mercado a cada semana, e, na pressa para colocá-los em operação, as informações sobre esses parâmetros críticos de desempenho analítico e diagnóstico e as informações exclusivas do fabricante, muitas vezes, ainda não estão divulgadas.⁽⁶⁾

Por enquanto, a OMS recomenda os exames de detecção de Ag por imunoenaios para monitorar a incidência da COVID-19, particularmente, em regiões remotas ou grupos fechados, como escolas, presídios e casas de permanência de longa duração.⁽²⁴⁾ Novas tecnologias, como métodos baseados em CRISPR (repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas) e LAMP (amplificação isotérmica mediada por alça) aplicados em testes laboratoriais remotos, devem fornecer sistemas de ensaio rápidos, simples, de baixo custo, portáteis e estáveis à temperatura configurados para locais com recursos limitados.⁽⁶⁾ Considerando-se a possibilidade de que a COVID-19 permanecerá na população como os vírus da gripe, um método de teste multiplex para múltiplas doenças deve ser considerado como uma plataforma de teste de rotina no futuro.⁽⁶⁾

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram o pobre valor diagnóstico dos imunoenaios, mas com potencial para estudos soropidemiológicos. Sugere-se que são essenciais mais estudos de validação analítica e acurácia diagnóstica de ensaios, principalmente dos reagentes nacionais.

Abstract

The rapid characterization of the coronavirus-2 (SARS-CoV-2) genome has mobilized the large-scale production of diagnostic methods. Regulatory agencies have conditionally approved the emergency use of several of them. In the health emergency, numerous tests were used without proper knowledge of quality. The aim of this narrative review was to highlight the diagnostic accuracy of serological methods for the diagnosis of COVID-19 in terms of clinical sensitivity and specificity. The diagnostic sensitivity varied up to 50% between studies, while the specificity showed less variation, however, the same brand even showed a variation of 32%. Considering the >95% specificity criteria defined by the FDA, only one test brand for detection of IgG and one

for IgM reached the goal. For the detection of IgA and IgA+IgM, the only brands presented did not reach the goal. Among the 5 marks for detecting IgM+IgG, only one did not reach clinical specificity. For total Ig, both brands had acceptable specificity. Considering the criterion of clinical sensitivity >90%, only 6 of the 25 studies with different brands of assays for detection of IgG present the specified performance, none of which are Brazilian. None of the brands of assays for detecting IgM and IgM+IgG showed the specified performance. The only brand presented for detection of IgA+IgM reached the target specified by the FDA. Immunochromatographic assays showed lower sensitivity. The results demonstrated the poor diagnostic value of immunoassays, but with potential for seroepidemiological studies. More studies on analytical validation and diagnostic accuracy of assays are essential, especially for national reagents.

Keywords

Diagnostic accuracy; COVID-19; IgG; IgM; serological tests; SARS-CoV-2

REFERÊNCIAS

- Uhteg K, Jarrett J, Richards M, Howard C, Morehead E, Geahr M, et al. Comparing the analytical performance of three SARS-CoV-2 molecular diagnostic assays. *J Clin Virol*. 2020 Jun;127:104384. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104384.
- FDA. U.S. Food & Drug Administration. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Emergency Use Authorizations for Medical Devices. Disponível em: <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-use-authorizations-medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices>. Acesso em 04 de ago de 2021.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Produtos para diagnóstico in vitro da COVID-19. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/produtos-parasaude/coronavirus>. Acesso em 04 de ago de 2021.
- Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, Faggian D, Plebani M. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 25;58(7):1081-1088. doi: 10.1515/cclm-2020-0443.
- Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2: a narrative review. *Ann Intern Med*. 2020 Jun 2;172(11):726-734. doi: 10.7326/M20-1301.
- Giri B, Pandey S, Shrestha R, Pokharel K, Ligler FS, Neupane BB. Review of analytical performance of COVID-19 detection methods. *Anal Bioanal Chem*. 2021 Jan;413(1):35-48. doi: 10.1007/s00216-020-02889-x.
- Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol*. 2020 Oct;5(10):1299-1305. doi: 10.1038/s41564-020-0761-6.
- Westgard, JO. Glossary of QC terms. Definitions of the key terms in quality control and assurance are obtained from documents of professional societies and organizations such ASQ, IFCC, CLSI, ISO, CAP. Disponível em: <https://www.westgard.com/glossary.htm>. Acesso em 01 ago de 2021.
- Mak GC, Lau SS, Wong KK, Chow NL, Lau CS, Lam ET, et al. Analytical sensitivity and clinical sensitivity of the three rapid antigen detection kits for detection of SARS-CoV-2 virus. *J Clin Virol*. 2020 Dec;133:104684. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104684.
- FDA. U.S. Food & Drug Administration. In Vitro Diagnostic EUAs. Disponível em: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas>. Acesso em 21 fev 2021.
- Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev* 2020 Jun 25;6(6):CD013652. doi: 10.1002/14651858.CD013652.
- Bastos ML, Tavaziva G, Abidi SK, Campbell JR, Haraoui LP, Johnston JC, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2020;370:m2516. doi: 10.1136/bmj.m2516.
- Castro R, Luz PM, Wakimoto MD, Veloso VG, Grinsztejn B, Perazzo H. COVID-19: a meta-analysis of diagnostic test accuracy of commercial assays registered in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2020 Mar-Apr;24(2):180-187. doi: 10.1016/j.bjid.2020.04.003.
- Cota G, Freire ML, de Souza CS, Pedras MJ, Saliba JW, Faria V, et al. Diagnostic performance of commercially available COVID-19 serology tests in Brazil. *Int J Infect Dis*. 2020 Dec;101:382-390. doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.008.
- 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. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoizjZzMDEONGU0tN2M4Yi00NTZiLTliN2MtMzA2YTZkMjcjYzNDRhliwidCI6ImI2N2FmMjNmLWMzZjMtNGQzNS04MGM3LWl3MDg1ZjVlZGQ4MSJ9>. Acesso em 01 de ago de 2021.
- Teste COVID-19. Programa de avaliação de kits de diagnóstico para SARS-CoV-2. Disponível em: <https://testecovid19.org/avaliacoes/>. Acesso em 01 de ago de 2021.
- ControlLab. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Segunda avaliação de ensaio de proficiência pioneiro para os principais métodos de detecção do SARS-CoV2. Disponível em: https://d3q24xqho8r0.cloudfront.net/wp-content/uploads/Relatorio_EP_SARSCOV2_280920_v1_pt_final-1.pdf. Acesso em 03 de ago de 2021.
- Alemay A, Baró B, Ouchi D, Rodó P, Ubals M, Corbacho-Monné M, et al. Analytical and clinical performance of the panbio COVID-19 antigen-detecting rapid diagnostic test. *J Infect*. 2021 May;82(5):186-230. doi: 10.1016/j.jinf.2020.12.033.
- Yang Y, Yang M, Shen C, Wang F, Yuan J, Li J, et al. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *medRxiv* 2020doi: 10.1101/2020.02.11.20021493 Disponível em: <https://www.medrxiv.org/content/medrxiv/early/2020/02/17/2020.02.11.20021493.full.pdf>. Acesso em 04 de ago 2021.
- Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W, et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a report of 1014 cases. *Radiology*. 2020 Aug;296(2):E32-E40. doi: 10.1148/radiol.20200642.
- Baćura AS, Dorotić M, Grošić L, Džimbeg M, Dodig S. Current status of the lateral flow immunoassay for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs. *Biochem Med (Zagreb)*. 2021 Jun 15;31(2):020601. doi: 10.11613/BM.2021.020601.
- Kuna AT, Hanžek M, Vukasović I, NikolacGabaj N, Vidranski V, Čelap I, et al. Comparison of diagnostic accuracy for eight SARS-CoV-2 serological assays. *Biochem Med (Zagreb)*. 2021 Feb 15;31(1):010708. doi: 10.11613/BM.2021.010708.
- Liu L, Wang P, Nair MS. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature* 2020 Aug;584(7821):450-456. doi: 10.1038/s41586-020-2571-7.
- WHO. World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2-infection-using-rapid-immunoassays>. Acesso em 04 de ago 2021.
- Plaga A, Wei R, Olson E, Payto D, Harrington J, Nwe-Kissig PT, et al. Evaluation of the Clinical Performance of 7 Serological Assays for SARS-CoV-2 for Use in Clinical Laboratories. *J Appl Lab Med*. 2021 Jul 7;6(4):998-1004. doi: 10.1093/jalm/jfab038.
- Trabaud MA, Icard V, Milon MP, Bal A, Lina B, Escuret V. Comparison of eight commercial, high-throughput, automated or ELISA assays detecting SARS-CoV-2 IgG or total antibody. *J Clin Virol*. 2020 Nov;132:104613. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104613.

27. Oved K, Olmer L, Shemer-Avni Y, Wolf T, Supino-Rosin L, Prajrod G, et al. Multi-center nationwide comparison of seven serology assays reveals a SARS-CoV-2 nonresponding seronegative subpopulation. *E Clinical Medicine*. 2020, 29-30. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100651

Correspondência

Flávia Martinello

Departamento de Análises Clínicas

Centro de Ciências da Saúde

Universidade Federal de Santa Catarina

E-mail: flavia.martinello@ufsc.br

COVID-19 Associada à Aspergilose Pulmonar (CAPA): uma revisão sistemática

COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA): A systematic review

Eduardo Marques de Araujo¹

Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto²

Resumo

Os esforços envidados para o controle e extinção da pandemia do novo Coronavírus-2019 (COVID-19) não estão obtendo êxito, e já atingiram critérios epidemiológicos alarmantes, tendo infectado mais de dez milhões de pessoas no Brasil e mais de 100 milhões no mundo. A infecção por este vírus pode causar a síndrome respiratória aguda grave, com danos diretos ao epitélio das vias aéreas, permitindo a instalação de patógenos secundários de origem bacteriana e fúngica, como exemplo os fungos do gênero *Aspergillus*, que podem causar complicações nas manifestações clínicas e aumentar a taxa de mortalidade. Porém, mesmo com a alta probabilidade de infecção por estes fungos, verifica-se que são poucos os estudos direcionados a este assunto, como também, em alguns países, não há critério para identificar os fungos patógenos em geral, sendo possível que o verdadeiro número de coinfeções e a necessidade de internação em UTI seja maior. Portanto, neste artigo, revisamos estudos anteriores sobre a CAPA em bancos de dados eletrônicos e discutimos a necessidade do diagnóstico da aspergilose invasiva para aumento da sobrevida dos pacientes envolvidos. Neste trabalho recomendamos o diagnóstico correto e precoce das infecções fúngicas invasivas em pacientes com COVID-19, e que novos estudos sobre o tema sejam realizados para padronizar um diagnóstico eficaz e comprovado.

Palavras-chave

Aspergilose Pulmonar Invasiva; Coronavírus; Erros de Diagnóstico

INTRODUÇÃO

O surto de COVID-19, que até o momento se mantém fora de controle no mundo, teve grande impacto e provocou grandes mudanças na sociedade mundial, nos sistemas de saúde e, principalmente, em hospitais e laboratórios de microbiologia clínica nos últimos meses. É possível afirmar que este vírus mudou o mundo. Apesar dos aprofundados estudos focando em seu controle, uma das alternativas para pacientes críticos é a utilização de corticosteroides, que comumente podem acarretar lesões epiteliais nos pulmões, o que torna propício o desenvolvimento de coinfeções fúngicas, que nos pulmões tem como principal agente etiológico os *Aspergillus*, sendo assim possível a instalação da COVID-19 associada a aspergilose pulmonar (CAPA).^(1,2) Esta patologia, uma infecção pulmonar ou

traqueobrônquica de grande impacto e baixa resolatividade, é relatada em vários países,⁽³⁻¹²⁾ e no entanto, mesmo com a devida importância na sobrevida dos pacientes, o verdadeiro número de coinfeção ainda pode não ser fiel ao que tem sido relatado,^(1,3,14) visto que todos os exames micológicos raramente são realizados na grande maioria dos centros médicos-hospitalares no mundo,⁽¹⁵⁾ resultando em uma falta indevida de informações, dificultando o diagnóstico e o tratamento para esse tipo de enfermidade.

Os poucos estudos sobre a CAPA em andamento trazem números alarmantes, a exemplo do estudo realizado na França, onde foram descritos nove pacientes com COVID-19 e aspergilose pulmonar invasiva (33% dos 27 internados na UTI com COVID-19),⁽³⁾ e na Alemanha, onde os prontuários foram revisados,⁽⁴⁾ demonstrando a necessidade de estudos mais extensos relatando a ocorrência dessa coinfeção em

¹ Mestre, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil.

² Doutor, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102115

todo o mundo. Portanto, neste artigo, revisamos estudos sobre aspergilose invasiva em infecções causadas pelo COVID-19 e a necessidade e eficiência do diagnóstico atualmente usado para aumentar a taxa de sobrevivência de indivíduos afetados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Protocolo de revisão sistemática

O presente estudo seguiu a recomendação das diretrizes e dos procedimentos do PRISMA (Itens Principais para Relatórios de Revisões Sistemáticas e Meta-análises), para a preparação de revisões sistemáticas, definidas como um estudo organizado, do maior número de resultados de pesquisas sobre um tema, tentando explicar as diferenças encontradas ao longo do mesmo. Nenhum protocolo foi utilizado para avaliar a qualidade das publicações incluídas no estudo.

Estratégia de pesquisa e critérios de elegibilidade

Na primeira fase do estudo, foi realizada uma busca em bases de dados eletrônicos, incluindo Pubmed, Google Scholar e Web of Science, que foram pesquisadas com as seguintes palavras-chave: COVID-19, SARS-CoV-2, influenza, aspergilose invasiva e infecções invasivas fúngicas. Por se tratar de um evento recente, o intervalo de tempo estabelecido terminou em 2021 e não tem data de início.

Para a segunda fase, os artigos foram selecionados segundo os seguintes critérios: ser artigo original, ter sido publicado em inglês, português ou espanhol, e relatar, descrever ou revisar aspergilose invasiva como coinfeção em pacientes com o novo vírus corona.

DISCUSSÃO

Os fungos do gênero *Aspergillus* são patógenos oportunistas que podem causar colonização em cavidades preexistentes, infecção propriamente dita, processos alérgicos e intoxicações, sendo o trato respiratório a principal porta de entrada para esse microrganismo e local de infecção.⁽¹⁵⁾ Essa patologia está associada a altas taxas de mortalidade e é uma complicação proeminente em pacientes com imunossupressão profunda, como aqueles submetidos a transplante hematopoietico, bem como aqueles com lesão pulmonar estrutural que recebem corticosteroides para sua condição de base, e pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica.^(16,17)

Ainda não se sabe se o SARS-CoV-2 predispõe o hospedeiro à aspergilose invasiva como um fator independente do hospedeiro, e a verdadeira incidência, resultados e mecanismos fisiopatológicos da doença invasiva não foram elucidados neste cenário,⁽¹⁸⁾ entretanto, sabemos que

o uso de corticosteroides e o dano epitelial a esse órgão causado por essa infecção são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de coinfeções bacterianas ou fúngicas. Além disso, os efeitos colaterais das vias de reconhecimento do hospedeiro necessárias para a ativação da imunidade antiviral podem, paradoxalmente, contribuir para um ambiente inflamatório altamente permissivo que favorece a patogênese.⁽¹⁴⁾

Por se tratar de um vírus novo, muitos profissionais consideram como base os números de infecções anteriores, como influenza, e estipulam que a CAPA pode ser um fator de risco independente para aspergilose invasiva, com uma incidência de 19%, em comparação com 5% em pacientes de UTI com pneumonia,⁽¹⁹⁾ evidenciando que a coinfeção é possível, e que a COVID-19, em sua forma grave, promove o desenvolvimento de aspergilose, porém a negligência e falta de notificações tornam esta doença subnotificada, onde o número total de casos pode ser superior ao relatado.^(1,3,14)

Um diagnóstico ideal global está sendo ativamente investigado em um estudo exploratório multinacional em andamento em conjunto com a Confederação Europeia de Micologia Médica (ECMM). Esta entidade define de modo geral que a CAPA é uma infecção pulmonar ou traqueobrônquica que pode ser comprovada por detecção histopatológica ou microscópica direta, ou ambas, de elementos fúngicos que são morfológicamente consistentes com fungos do gênero *Aspergillus*.⁽²⁴⁾ Já Gangneux et al.,⁽¹³⁾ que enfatiza o diagnóstico em pacientes críticos internados em UTI, recomenda a triagem e diagnóstico precoce com métodos não culturais, portanto o teste de galactomanana por líquido bronco-alveolar é uma importante ferramenta, porque altas indicações dessa proteína foram observadas nesses indivíduos, viabilizando esse diagnóstico para esse tipo de caso.⁽⁴⁾ Portanto, o uso de galactomanana no lavado bronco-alveolar é uma possível forma de estabelecer o diagnóstico precoce da CAPA em pacientes críticos de risco, sendo a alternativa mais promissora para o diagnóstico.^(21,22,23) Em resumo, os métodos mais comuns citados até o momento incluem a tentativa de detectar o fungo em meios de cultura de líquido bronco-alveolar e aspirado traqueal, além da utilização de testes sorológicos de biomarcadores, como galactomanana convencional, aspirado traqueal e amostras de soro. Outros testes de diagnóstico que podem ser úteis também incluem PCR de *Aspergillus*, soro 1,3-BD-glucano, ensaio de fluxo lateral de *Aspergillus* para detecção de galactomanana e o teste usando o dispositivo de fluxo lateral específico para *Aspergillus*.⁽¹⁴⁾

Em conclusão, além de todas as dificuldades são somadas a essas evidências diversas problematizações nesses diagnósticos. Nesses diversos métodos existe a formação de aerossóis que apresentam riscos para pacientes e profissionais de saúde,⁽²⁰⁾ além de que a sensibilidade e o desempenho dos testes de galactomanana, PCR de

Aspergillus e teste de 1,3-BD-glucano podem ser variáveis em casos com pacientes não imunocomprometidos e em relatórios iniciais, como também os sinais radiológicos e clínicos em pacientes não neutropênicos podem ser inespecíficos, tornando o diagnóstico em diversos casos inconclusivo. Somando-se a esses fatores, em diversos países, como exemplo o Brasil, não é bem aplicada e difundida a utilização de métodos de detecção preliminar de fungos na rotina hospitalar.^(3,4,18) Ressalte-se que a validade dos dados dessas escassas pesquisas com ênfase no diagnóstico da CAPA precisa ser confirmada em outros estudos, para que os profissionais de saúde disponham dessa ferramenta útil para decidir em que circunstâncias a terapia antifúngica deve ser iniciada precocemente. Lembrando que, para o sucesso completo do tratamento para essa patologia, ainda é necessária experiência com o uso empírico ou direcionado de antifúngicos no cenário COVID-19, principalmente em relação à eficácia, duração do tratamento e possíveis reações adversas a medicamentos no cenário de hepatotoxicidade.⁽⁵⁾

CONCLUSÕES

Com o conjunto de artigos levantados na revisão sistemática, foi possível avaliar que estudos são necessários para comprovar a eficácia dos testes para o diagnóstico da CAPA, visto que esta coinfeção desempenha um papel crítico na dissecação de eventos mecanísticos que resultam em aumento da susceptibilidade ao *Aspergillus*, tendo em vista que esta infecção está apenas começando a ser desvendada. Embora o foco principal dos médicos seja o controle da infecção bacteriana em COVID-19, ignorar as infecções fúngicas potencialmente fatais pode aumentar a taxa de mortalidade.

Não menos importante, há a necessidade de políticas internacionais de saúde coordenadas, que devem ser adotadas para garantir uma melhor visão global da pandemia e suas complicações patológicas, buscando homogeneidade na atenção à saúde, para que os reais impactos sejam mais facilmente percebidos e resolvidos com dados concretos e riqueza de informações. Com a gama de propostas aqui discutidas, a aplicabilidade dos testes antifúngicos em pacientes críticos internados em UTI é imprescindível, a fim de diminuir a mortalidade geral no contexto pandêmico vivenciado pela COVID-19.

Abstract

The new corona virus 2019 (COVID-19) is becoming unstoppable, and has already reached alarming epidemiological criteria, having infected more than 10,000,000 in Brazil and more than 100,000,000 worldwide. Infection with this virus can cause severe acute respiratory syndrome, which causes direct damage to the airway epithelium, allowing the invasion of secondary pathogens of bacterial and fungal origin, such as fungi of the genus Aspergillus, which can cause complications in clinical manifestations. and increase the mortality rate, however, even with the high probability of infection by these fungi, it appears

that there are few studies directed to this subject, and also, in some countries there is no criterion to identify pathogenic fungi in general, it is possible that the true number of co-infections and the need for ICU admission is greater. Therefore, in this article, we reviewed previous studies on CAPA in electronic databases, and discussed the need for the diagnosis of invasive aspergillosis to increase the survival of the patients involved. Therefore, in this work, we recommend the correct and early diagnosis of invasive fungal infections in patients with COVID-19, and that further studies on the subject be carried out to standardize an effective and proven diagnosis.

Keywords

Invasive Pulmonary Aspergillosis; Coronavirus Infections; Diagnostic Errors

REFERÊNCIAS

1. Clancy CJ, & Nguyen MH. (2020). COVID-19, superinfections and antimicrobial development: What can we expect?. *Clinical Infectious Diseases*.
2. Zhang G, Hu C, Luo L, Fang F, Chen Y, Li J, Peng Z, & Pan H. (2020). Clinical features and short-term outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Journal of Clinical Virology*, 104364.
3. Alanio A, Dellièrre S, Fodil S, Bretagne S & Mégarbane B. (2020). Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. *The Lancet Respiratory Medicine*.
4. Koehler P, Cornely O, Böttiger, B, Dusse F, Eichenauer A, Fuchs, Hallek M, Jung N, Klein F, Persigehl T, Rybníček J, Kochanek M, Böll B, & Shimabukuro-Vornhagen A. (2020). COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses*.
5. Sharma A, Hofmeyr A, Bansal A, Thakkar D, Lam L, Harrington Z, & Bhonagiri D. (2020). COVID-19 associated pulmonary aspergillosis (CAPA): An Australian case report. *Medical Mycology Case Reports*.
6. Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky PH, Behillil S, Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Donati F, Le Hingrat Q, Enouf V, Houhou-Fidouh N, Valette M, Mailles A, Lucet JC, Mentre F, Duval X, Descamps D, Malvy D, Timsit JF, Lina B, van-der-Werf S, & Yazdanpanah Y. (2020). Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *The Lancet Infectious Diseases*.
7. Blaize M, Mayaux J, Nabet C, Lampros A, Marcelin AG, Thellier M, Piarroux R, Demoule A, & Fekkar A. (2020). Fatal invasive aspergillosis and coronavirus disease in an immunocompetent patient. *Emerging infectious diseases*, 26(7), 1636.
8. Lescure FX, Bouadma L, Nguyen D, Parisey M, Wicky PH, Behillil S, Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Donati F, Le Hingrat Q, Enouf V, Houhou-Fidouh N, Valette M, Mailles A, Lucet JC, Mentre F, Duval X, Descamps D, Malvy D, Timsit JF, Lina B, van-der-Werf S, & Yazdanpanah Y. (2020). Clinical and virological data of the first cases of COVID-19 in Europe: a case series. *The Lancet Infectious Diseases*.
9. Antinori S, Rech R, Galimberti L, Castelli A, Angeli E, Fossali T, Bernasconi D, Covizzi A, Bonazzetti C, Torre A, Carsana L, Tonello C, Zerbi P, & Nebuloni M. (2020). Invasive pulmonary aspergillosis complicating SARS-CoV-2 pneumonia: A diagnostic challenge. *Travel Medicine and Infectious Disease*.
10. Prates J, Valentin T, Hoenig M, Talakic E, Reisinger AC, & Eller P. (2020). Invasive pulmonary aspergillosis complicating COVID-19 in the ICU-A case report. *Medical Mycology Case Reports*.
11. Rutsaert L, Steinfert N, Van Hunsel T, Bomans P, Naesens R, Mertes H, Dits H, & Van Regenmortel N. (2020). COVID-19-associated invasive pulmonary aspergillosis. *Annals of Intensive Care*, 10(1), 1-4.
12. van Arkel AL, Rijpsma TA, Belderbos HN, van Wijngaarden P, Verweij PE, & Bentvelsen RG. (2020). COVID-19 Associated pulmonary aspergillosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, (ja).

13. Gangneux JP, Bournoux ME, Dannaoui E, Cornet M, & Ralph ZJ. (2020). Doenças fúngicas invasivas durante o COVID-19: Devemos estar preparados. *Journal De Mycologie Medicale*.
14. Arastehfar A, Carvalho A, van de Veerdonk FL, Jenks JD, Koehler P, Krause R, Cornely OA, S Perlin D, Lass-Flörl C, & Hoenigl M. (2020). COVID-19 Associated Pulmonary Aspergillosis (CAPA)—From Immunology to Treatment. *Journal of Fungi*, 6(2), 91.
15. Sidrim JJC, & Rocha MFG. (2004). *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan.
16. Kosmidis C, & Denning DW (2015). The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*, 70(3), 270-277.
17. Wang H, Ding Y, Li X, Yang L, Zhang W, & Kang W. (2003). Fatal aspergillosis in a patient with SARS who was treated with corticosteroids. *New England Journal of Medicine*, 349(5), 507-508.
18. Verweij PE, Gangneux JP, Bassetti M, Brüggemann RJM, Cornely OA, Koehler P, Lass-Flörl C, van de Veerdonk FL, Chakrabarti A, & Hoenigl M. (2020). Diagnosing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis. *The Lancet Microbe*, 1(2), e53-e55.
19. Schauwvlieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N, Verwijs R, Vanderbeke L, Van Tienen C, Lagrou K, Verweij PE, Van de Veerdonk FL, Gommers D, Spronk P, Bergmans DCJJ, Hoedemaekers A, Andrinopoulou ER, van den Berg CHSB, Juffermans NP, Hodiamont CJ, Vonk AG, Depuydt P, Boelens J, & Wauters J. (2018). Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 6(10), 782-792.
20. Wahidi MM, Lamb C, Murgu S, Musani A, Shojaaee S, Sachdeva A, Maldonado F, Mahmood K, Kinsey M, Sethi S, Mahajan A, Majid A, Keyes C, Alraiyes AH, Sung A, Hsia D, & Eapen G. (2020). American Association for Bronchology and Interventional Pulmonology (AABIP) statement on the use of bronchoscopy and respiratory specimen collection in patients with suspected or confirmed COVID-19 infection. *J Bronchology Interv Pulmonol*.
21. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, Spriet I, Verbeken E, & Van Wijngaerden E. (2008). Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(1), 27-34.
22. Lahmer T, Rasch S, Spinner C, Geisler F, Schmid RM, & Huber W. (2020). Invasive pulmonary aspergillosis in severe coronavirus disease 2019 pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection*.
23. Segrelles-Calvo G, Araújo GRS, Llopis-Pastor E, Carrillo J, Hernández-Hernández M, Rey L, Rodríguez Melean N, Escribano I, Antón E, Zamarro C, García-Salmónes M, & Frases S. (2020). Prevalence of opportunistic invasive aspergillosis in COVID-19 patients with severe pneumonia. *Mycoses*.
24. Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, Chen SCA, Colombo AL, Hoenigl M, Klimko N, Lass-Flörl C, Oladele RO, Vinh DC, Zhu LP, Böll B, Brüggemann R, Gangneux JP, Perfect JR, Patterson TF, Persigehl T, Meis JF, Ostrosky-Zeichner L, White PL, Verweij PE, & Cornely OA (2020). Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *The Lancet Infectious Diseases*.

Correspondência

Eduardo Marques de Araujo

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária,

Recife - PE - CEP: 50670-901

Prevalência de infecção pelo SARS-CoV-2 em profissionais de saúde em um Hospital Universitário no Rio de Janeiro durante a pandemia de COVID-19 em 2020

Prevalence of SARS-CoV-2 infection in healthcare professionals at a University Hospital in Rio de Janeiro during the COVID-19 pandemic in 2020

Mauricea Francisco da Silva Romero
Gonzalez¹

Ricardo de Souza Carvalho¹

Isabelle de Carvalho Rangel¹

Patrick Menezes¹

Beatriz Pereira de Azevedo¹

Fernando Raphael de Almeida Ferry¹

Resumo

A soroprevalência do SARS-CoV-2 foi determinada a partir de um inquérito epidemiológico transversal realizado no Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, nos meses de outubro a novembro de 2020, durante a pandemia de COVID-19, na população de funcionários que exercia atividade laboral naquele período. A caracterização sociodemográfica foi realizada, além da análise das associações entre as variáveis de interesse ou exposição com a infecção pelo SARS-CoV-2, para estabelecer quais sinais e sintomas foram de maior prevalência. Para o estudo foram coletadas amostras de sangue e utilizados ensaios imunocromatográficos (COVID-19 IgG/IgM ECO Test® e Medtest® Coronavírus (COVID-19) IgG/IgM), para detectar IgG e IgM anti-SARS-CoV-2. Um cálculo amostral obtendo-se 391 profissionais de saúde demonstrou que 173 (44,2%) indivíduos apresentaram ao menos um resultado positivo para infecção pelo SARS-CoV-2. Não houve diferença significativa entre as medianas das idades dos pacientes que apresentaram infecção pelo SARS-CoV-2 (mediana 40 anos, IIQ 34-53) e dos que não apresentaram infecção (mediana 39 anos, IIQ 32-49), valor de $P = 0,148$. Também não houve diferença entre o sexo dos profissionais com infecção e sem infecção pelo SARS-CoV-2 ($OR = 1,02$; IC 95% 0,59 – 1,78). Dos 173 profissionais que apresentaram infecção pelo SARS-CoV-2, 70 (40,5%) relataram sintomas relacionados à COVID-19, enquanto 41 (23,7%) profissionais relataram que não apresentaram nenhum sintoma e 62 (35,8%) não informaram sobre presença ou não de sintomas, sendo excluídos da análise. Os sintomas mais frequentemente apresentados pelos profissionais infectados foram: cefaleia 46,5% (59/127); perda de olfato 32,3% (41/127); perda de paladar 30,7% (39/127); tosse seca 27,6% (35/127); diarreia 24,4% (31/127); dores no corpo 27,6% (35/127); outros 13,4% (17/127); dores nas pernas 11,8% (15/127); tonteira 11,8% (15/127) e febre 9,4% (12/127). Estabelecer um protocolo de vigilância com um teste fácil e rápido para as políticas de COVID-19 entre os profissionais na linha de frente e atuantes na assistência é imperativo para o controle da transmissão de SARS-CoV-2 e definir critérios epidemiológicos que orientem a tomada de decisão quanto ao isolamento de profissionais infectados sintomáticos e assintomáticos.

Palavras-chave

COVID-19; SARS-CoV-2; Soroprevalência

INTRODUÇÃO

O Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) foi notificado pela primeira vez em 31 de dezembro de 2019 à Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo identificado como o patógeno que causa a doença de Coronavírus 19 (COVID-19). Trata-se

de um betacoronavírus pertencente ao mesmo subgênero de epidemias anteriores: Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV), na China em 2002, e o Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), no Oriente Médio em 2012, sendo transmitido através de gotículas respiratórias e aerossóis de pessoas infectadas.^(1,2)

¹ Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro-UNIRIO, Rio de Janeiro, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100959

Após o primeiro surto de COVID-19 em Wuhan, China, uma onda de infecções causadas pelo SARS-CoV-2 espalhou-se da China para os continentes asiático, europeu, africano, americano e Oceania, levando a OMS a declarar, em 30 de janeiro, estado de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) e logo após, em 11 de março de 2020, pandemia por COVID-19,^(3,4) adotando diretrizes para o diagnóstico laboratorial, manejo clínico, prevenção da infecção, controle nos serviços de saúde, comunicação de riscos e envolvimento da comunidade.^(5,6)

O primeiro caso registrado e notificado pelo Ministério da Saúde (MS) de infecção por COVID-19 no Brasil foi o de um homem após retorno de viagem da Itália, em 26 de fevereiro de 2020. Logo após, houve um aumento dramático de casos de pessoas infectadas, levando o governo brasileiro em março de 2020 a implementar medidas de distanciamento físico.⁽⁷⁾

A sintomatologia causada pela COVID-19 assemelha-se à de outras viroses e as Diretrizes para o Diagnóstico e Tratamento do COVID-19 pela Comissão Nacional de Saúde da China classificou a gravidade do COVID-19 em três estágios: leve, quando os sintomas clínicos são leves, sem achados radiológicos anormais; moderado, quando há a manifestação de febre, tosse e outros sintomas estão presentes com pneumonia na tomografia computadorizada (TC) de tórax, e grave, quando há desconforto respiratório com frequência respiratória abaixo de 30/min, saturação de oxigênio $\leq 93\%$, pressão parcial de oxigênio no sangue arterial ≤ 300 mmHg e crítico, podendo evoluir para insuficiência respiratória, choque, tromboembolismo e disfunções vitais, exigindo monitoramento em unidades de tratamento intensivo.⁽⁸⁾ A taxa de letalidade varia segundo faixa etária e condições clínicas associadas.⁽²⁾ Hoje, a COVID-19 representa grande ameaça à saúde pública por já ter causado a morte em 6% dos infectados no mundo. Dados recentes da OMS computaram 98,2 milhões de casos notificados e mais de 2,1 milhões de mortes desde o início da pandemia.⁽⁹⁾

A pesquisa do vírus SARS-CoV-2 constitui importante etapa no monitoramento da taxa de incidência e gerenciamento do processo epidemiológico durante a pandemia de COVID-19 e os testes laboratoriais para o seu diagnóstico podem ser divididos em duas categorias: aqueles que detectam diretamente o vírus (seu genoma ou antígenos) e aqueles que detectam a resposta imunológica humana à sua presença (anticorpos IgM, IgA e IgG). Apesar de o método RT-PCR (uma técnica para amplificar um fragmento de RNA específico em DNA complementar usando a enzima transcriptase reversa) ter sido aprovado pela OMS como o “padrão ouro” de diagnóstico para detecção do SARS-CoV-2, testes de resposta imunológica são importantes para determinar a imunidade protetora em várias categorias da população infectada pelo SARS-CoV-2, permitindo monitorar

o progresso da infecção em pacientes hospitalizados, rastreamento de contactantes e sobretudo fornecer vigilância epidemiológica em nível regional, podendo ser realizados após o período agudo da doença ou exposição com infecção assintomática, para avaliar a resposta imunológica e sua duração, bem como respostas à vacinação contra o vírus. Desta forma, o teste rápido que detecta a presença de anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2 pode ser utilizado para o estudo em uma população com o objetivo de estudar a sua imunidade contra a COVID-19.⁽¹⁰⁾

Estudos de Oliveira et al.,⁽¹¹⁾ a partir de um inquérito sorológico com pacientes ambulatoriais do Hospital das Clínicas na cidade de São Paulo (Brasil), demonstraram que 32,8% dos participantes que testaram positivo para anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 eram assintomáticos. Neste mesmo contexto, Hallal et al.,⁽¹²⁾ em estudo semelhante porém com um grande estudo transversal onde foram realizados dois inquéritos sorológicos de Soroprevalência em 133 cidades englobando todos os estados brasileiros, demonstraram a alta heterogeneidade da prevalência com uma variação de 0% a 25,4%. Estas pesquisas de Oliveira e Hallal concluíram que a proporção de pacientes que desconheciam ter tido contato com o vírus reflete a escassez de exames realizados na população.⁽¹³⁾

Embora haja estudos de prevalência da COVID-19 na população mundial em geral, há uma compreensão limitada das taxas de infecção entre os profissionais de saúde, mesmo estes representando um componente particularmente importante nesta pandemia por SARS-CoV-2.⁽¹⁴⁾ Indo de encontro com essa necessidade, alguns estudos de prevalência de anticorpos para SARS-CoV-2 entre profissionais de saúde tem demonstrado os fatores de risco para sua transmissão.

Os profissionais que trabalham na assistência à saúde na linha de frente no combate à pandemia causada pela COVID-19 colocam-se em posição de maior risco à infecção do que outros indivíduos da comunidade⁽¹⁵⁾ e a falta de apresentações clínicas que caracterizem os indivíduos assintomáticos representam grande desafio para o controle da pandemia. Desta forma, o estudo da transmissão assintomática e suas implicações para a vigilância refletem a importância do estudo temporal e a dinâmica da infecção.⁽¹⁰⁾

Pesquisas realizadas em um hospital universitário, na Turquia demonstraram que, entre profissionais assistenciais, há um alto risco de transmissão da SARS-CoV-2 ao fornecer cuidados aos pacientes, apontando para a importância da pesquisa periódica do vírus, com o objetivo de detectar precocemente e promover o isolamento destes profissionais infectados.⁽¹⁶⁾

Sotgiu et al.,⁽¹⁷⁾ utilizaram um teste rápido de imunoenensaio (Fluxo Lateral *Point-of-Care*) e demonstraram que 7,4% dos profissionais em atividade possuíam imunoglobulinas IgG e que 14,4%, apesar de assintomáticos, possuíam a doença ativa, apresentando imunoglobulinas IgM.

Estudos de Sotgiu e colaboradores⁽¹⁷⁾ demonstraram que os resultados encontrados nos estudos de prevalência demonstram a importância em se obter respostas às questões epidemiológicas a respeito de anticorpos para COVID-19. Durante a pandemia, métodos como os de testagens simples, rápidos e em massa para detectar a infecção por SARS-CoV-2 são fundamentais para a tomada de medidas eficazes e de vigilância no combate à infecção. Desta forma, o teste rápido de Imunoensaio de fluxo lateral (*LFIA*) para o diagnóstico de *COVID-19*, representa uma *tecnologia* eficiente para o diagnóstico rápido de infecções por coronavírus. Estes testes são realizados pela metodologia da imunocromatografia,⁽¹⁸⁾ são fabricados na forma de *kits* e requerem apenas uma gota de sangue, soro ou plasma. Os resultados são lidos visualmente pelo aparecimento de faixas nas zonas de controle e testes podem ser usados para estudos de triagem em locais como estações ferroviárias, aeroportos, clínicas privadas, hospitais rurais e unidades de diagnóstico não equipadas. Sua aplicação mais racional é a triagem em massa da população de grupos de risco, bem como de pessoas com uma forma assintomática da doença.^(19,20)

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade de três testes imunocromatográficos (ICT) para detecção rápida de anticorpos contra SARS-CoV-2,⁽²¹⁾ destacou a importância da realização dos testes sorológicos quando o tempo de início dos sintomas for maior que uma semana, uma vez que a sensibilidade dos três ensaios de ICT foi notavelmente maior durante os estágios intermediário e tardio da doença.

OBJETIVOS

Realizar a soroprevalência qualitativa de anticorpos IgG e IgM anticoronavírus nos profissionais de saúde sintomáticos ou assintomáticos, das áreas assistencial e administrativa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, no Rio de Janeiro, através de testes rápidos imunocromatográficos.

MATERIAIS E MÉTODOS

A iniciativa do estudo de prevalência de infecção pelo SARS-CoV-2 entre os profissionais de saúde do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle foi proposta pela direção da instituição, que teve como objetivo principal quantificar a real exposição dos seus profissionais ao SARS-CoV-2, desde a decretação da pandemia pelo novo coronavírus pela Organização Mundial de Saúde em 11 de março de 2020,⁽¹³⁾ e, secundariamente, subsidiar tomadas de decisões a respeito de medidas de prevenção e bloqueio da difusão da COVID-19 entre os trabalhadores do hospital. Deste modo, o estudo foi devidamente apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUGG e todos os participantes que concordaram em participar do estudo assinaram o TCLE.

Para realização da pesquisa foi realizado o cálculo amostral tomando como base a população total de profissionais de saúde do hospital de 1.958 indivíduos, segundo o departamento de gestão de pessoas da instituição, entre médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, residentes, recepcionistas, assistentes sociais, técnicos administrativos, entre outros. Tomou-se como base uma margem de erro amostral de 4,5% e um nível de confiança de 95% obtendo-se um tamanho amostral de 391 profissionais.

Todos os profissionais testados foram informados sobre os objetivos do estudo, riscos e vantagens. O material e as informações só foram coletados após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Para execução dos testes foram adquiridos dois testes imunocromatográficos para pesquisa de anticorpos IgM e IgG para SARS-CoV-2: o *kit* COVID-19 IgG/IgM ECO Test® (ECO DIAGNÓSTICA, Nova Lima - MG, Brasil), doravante denominado TR-ECO e o *kit* Medtest Coronavírus (COVID-19) IgG/IgM (MedLevensohn e Hangzhou Biotest Biotech, Hangzhou, China), doravante denominado TR-MEDTEST. Ambos os testes se trata de ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral sobre membrana para detecção qualitativa em 10-15min de AC IgM e IgG de maneira individualizada para o SARS-CoV-2. Segundo a análise de acurácia para testes diagnósticos registrados na ANVISA para a COVID-19,⁽⁵⁾ ambos os testes demonstraram alta sensibilidade e especificidade (Quadro 1).

Quadro 1 - Realização de testes diagnósticos aprovados pela ANVISA no Brasil para COVID-19

COVID-19 IgG/IgM ECO Test	MedTest coronavirus (COVID-19)
IgG Sensibilidade: 95% Especificidade: 99%	IgG Sensibilidade: 97,4% (95%CI: 86,2-99,9%) Especificidade: 99,3% (95%CI: 96,2-99,9%) Precisão: 98,9 % (95%CI: 96,1-99,9%)
IgM Sensibilidade: 90% Especificidade: 94%	IgM Sensibilidade: 86,8% (95%CI: 71,9%-95,6%) Especificidade: 98,6% (95%CI: 95,0%-99,8%) Precisão: 96,1% (95%CI: 92,2%-98,4%)

Fonte: Bulas TR-ECO® / TR-MEDTEST®

O protocolo para realização do estudo consistiu inicialmente na realização de pesquisa de AC através do TR-ECO em todos os profissionais de saúde convocados para testagem entre o período de 10/09/2020 a 12/11/2020. Todos os indivíduos da pesquisa concordaram em realizar um segundo teste imunocromatográfico comparativo, no caso o TR-MEDTEST, simultaneamente com o TR-ECO, isto é, com

a mesma amostra de sangue coletado. Todos os profissionais participantes foram submetidos a um pequeno questionário e responderam sobre sinais e sintomas relacionados à COVID-19, realização de RT-PCR para SARS-CoV-2, desempenho de função assistencial ou administrativa, participação na assistência direta a pacientes com COVID-19, presença de comorbidades, além de sexo e idade. Para os casos de profissionais com critérios clínicos ou epidemiológicos, bem como todos os casos com detecção de AC IgM reagente, independente do teste imunocromatográfico realizado, foram afastados das atividades laborativas e submetidos ao RT-PCR para SARS-CoV-2.

Para o estudo foi considerado como critério de infecção pelo SARS-CoV-2 (atual ou passada) a presença de ao menos um resultado positivo em qualquer um dos testes executados para detecção de infecção pelo SARS-CoV-2 (RT-PCR, IgG ou IgM).

Para estudo dos dados, foram realizadas análises descritivas dos testes realizados, da prevalência de infecção pelo SARS-CoV-2 e das características dos profissionais de saúde. Para análise da normalidade foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov. Para análise das associações entre as variáveis de interesse ou exposição com a infecção pelo SARS-CoV-2, foram realizados o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fischer e para

a comparação de medianas foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. Para análise de concordância foi utilizado o coeficiente de concordância *kappa* (*k*) entre os testes imunocromatográficos em comparação com o RT-PCR para SARS-CoV-2. Para quantificar os fatores preditores de infecção pelo SARS-CoV-2, foram realizadas a regressão logística uni e multivariada. A força da associação entre os fatores preditores foi expressa como razão de chances (OR, do inglês *Odds-Ratio*), juntamente com o intervalo de confiança de 95% e P-valor. As análises estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de $P \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico IBM SPSS®, versão 27.0 para Mac.

RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 391 profissionais de saúde que realizaram ao menos uma testagem para pesquisa de anticorpos IgG/IGM e/ou RT-PCR para SARS-CoV-2, segundo os critérios anteriormente citados, resultando em 891 testes imunocromatográficos para detecção de AC IgM/IgG – 391 profissionais realizaram TR-ECO (Tabela 1) e TR-MEDTEST (Tabela 2) e 109 teste de RT-PCR (Tabela 3). Os resultados dos testes imunocromatográficos e do RT-PCR estão apresentados nas respectivas tabelas.

Tabela 1 - Resultado TR-ECO

		Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida	Porcentagem acumulativa
Válido	IgM+/IgG+	8	2,0	2,0	2,0
	IgM-/IgG+	146	37,3	37,3	39,4
	IgM-/IgG-	237	60,6	60,6	100,0
	Total	391	100,0	100,0	

Tabela 2 - Resultado TR-MEDTEST

		Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida	Porcentagem acumulativa
Válido	IgM+/IgG+	41	10,5	10,5	10,5
	IgM+/IgG-	11	2,8	2,8	13,3
	IgM-/IgG+	42	10,7	10,7	24,0
	IgM-/IgG-	297	76,0	76,0	100,0
	Total	391	100,0	100,0	

Tabela 3 - Resultado RT-PCR SARS-CoV-2

		Frequência	Porcentagem válida
Válido	Não Reativo	75	68,8%
	Reativo	34	31,2%
	Total	109	100,0%

Dos profissionais participantes, a maioria composta por 271 indivíduos (69,7%) eram do sexo feminino e 118 (30,3%) do sexo masculino. A mediana da idade de todos os profissionais foi de 40 anos (IIQ 34-49). Quanto à atividade profissional, 181 (46,3%) profissionais desempenhavam atividade estritamente assistencial, isto é, diretamente no atendimento aos pacientes, e 100 (25,6%) profissionais desempenhavam atividades não-assistenciais; 110 (28,1%) profissionais não informaram atividade profissional. Quanto ao local das atividades, 268 (68,5%) profissionais desempenhavam suas atividades em áreas de enfrentamento à COVID-19, enquanto 13 (3,3%) profissionais desempenhavam suas atividades em outras áreas e 110 (28,1%) profissionais não informaram suas áreas de atuação.

Quanto aos resultados dos testes realizados para detecção do SARS-CoV-2, 178 profissionais (45,5% - IC 95% 40,4% - 50,6%) apresentaram ao menos um resultado positivo conforme critério da pesquisa para infecção pelo SARS-CoV-2. Não houve diferença significativa entre as medianas das idades dos pacientes que apresentaram infecção pelo SARS-CoV-2 (mediana 40 anos, IIQ 34-53) e dos que não apresentaram infecção (mediana 39 anos, IIQ 32-49), valor de $P = 0,148$. Também não houve diferença entre o sexo dos profissionais com infecção e sem infecção pelo SARS-CoV-2 (OR = 1,02; IC 95% 0,59 – 1,78).

Dos 178 profissionais que apresentaram infecção pelo SARS-CoV-2, apenas 115 (64,6%) responderam sobre a presença de sintomas relacionados à COVID-19, sendo que 71 (61,7%) relataram sintomas relacionados à COVID-19, enquanto que 44 (35,4%) dos profissionais relataram que não apresentaram nenhum sintoma, portanto considerados assintomáticos, e 63 não informaram sobre presença ou não de sintomas, sendo excluídos desta análise. Dos 127 relatos de sintomas relacionados à COVID-19 foram mais frequentemente apresentados pelos profissionais infectados: cefaleia 46,5% (59/127); perda de olfato 32,3% (41/127); perda de

paladar 30,7% (39/127); tosse seca 27,6% (35/127); diarreia 24,4% (31/127); dores no corpo 27,6% (35/127); outros 13,4% (17/127); dores nas pernas 11,8% (15/127); tonteira 11,8% (15/127) e febre 9,4% (12/127), conforme o Gráfico 1. Importante salientar que os indivíduos com infecção sintomática pelo SARS-CoV-2 apresentaram mais de um sintoma e por isso o somatório do percentual dos sintomas ultrapassa os 100%.

Para avaliar a concordância dos testes imunocromatográficos foi utilizado o coeficiente de concordância *kappa* (*k*). Para a detecção da IgG através do TR-ECO obteve-se um $k = 0,27$ ($p < 0,01$) e para a detecção da IgM pelo mesmo método um $k = 0,27$ ($p = 0,44$) tendo como teste de referência a detecção prévia do SARS-CoV-2 através de RT-PCR. Da mesma forma, foi realizada a mesma análise para a IgG do TR-MEDTEST, obtendo um $k = 0,40$ ($p < 0,01$) e para IgM pelo mesmo TR-MEDTEST, $k = 0,42$ ($p < 0,01$) (Tabela 4).

Em relação à soroconversão após infecção confirmada por RT-PCR para SARS-CoV-2, 23 (67,7%) pacientes dos 34 com RT-PCR reagente apresentaram IgG e/ou IgM reagentes com o TR-ECO, enquanto 11 pacientes (32,3%) não apresentaram detecção de AC para SARS-CoV-2 pelo teste. Resultados semelhantes foram obtidos pelo TR-ECO, com 22 (64,7%) pacientes apresentando AC IgG e/ou IgM detectados, enquanto 12 (35,3%) não apresentaram AC detectados pelo método (Quadro 2).

A regressão logística univariada foi realizada para cada sintoma isoladamente e os resultados da *Odds Ratio* (OR) e dos Intervalos de Confiança de 95% estão expressos na Tabela 5.

Foi também realizada uma regressão logística binária multivariada com o intuito de verificar quais os sintomas seriam preditores para infecção pelo SARS-CoV-2 e o modelo contendo os sintomas de perda de paladar, perda de olfato e tonteira foi estatisticamente significativo [$X^2(2) = 44,3$; $p < 0,0001$; R^2 Nagelkerke = 0,20], porém perda de paladar não apresentou significância ($p = 0,06$).

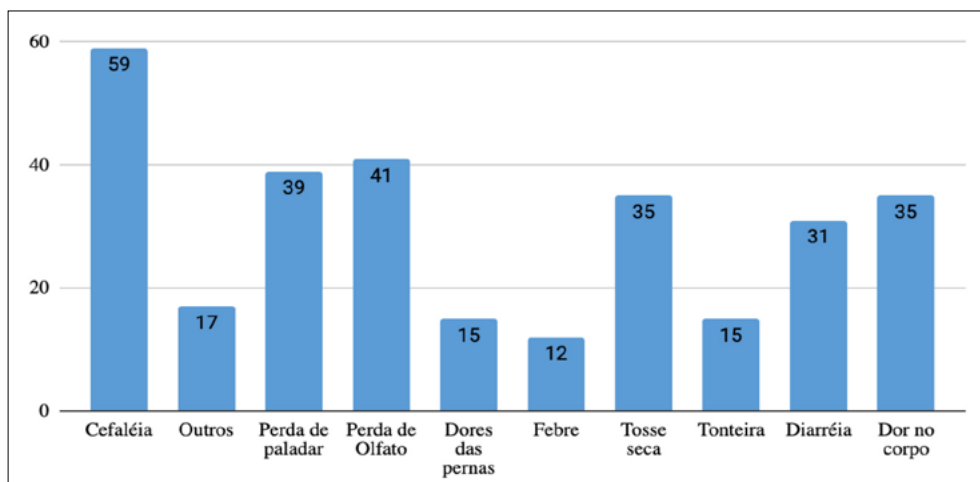


Gráfico 1. Frequência de sintomas relacionados à COVID-19 em pacientes com SARS-CoV-2 detectado.

Tabela 4 - Resultado da concordância dos TR com a detecção do SARS-CoV-2 por RT-PCR

		Kappa	P-valor	Interpretação
TR-ECO	IgG	0,27	<0,01	Sofrível
	IgM	0,27	0,44	Não significativa
TR-MEDTEST	IgG	0,40	<0,01	Sofrível
	IgM	0,42	<0,01	Regular

Quadro 2 - Resultado soroconversão RT-PCR SARS-COV-2 x Testes rápidos

Teste	Pesquisa de Anticorpo para SARS-CoV-2	Pacientes com RT-PCR SARS-CoV-s Detectável
TR-ECO	IgM e/ou IgG reagentes	23 (67,7%)
	IgM e IgG Não reagentes	11 (32,3%)
TR-MEDTEST	IgM e/ou IgG reagentes	22 (64,7%)
	IgM e IgG Não reagentes	12 (35,3%)

Tabela 5 - Tabela com resultado da Regressão Logística Univariada e Multivariada para infecção pelo SARS-CoV-2.

Sintomas preditores para SARS-CoV-2	Frequência N=127	Regressão Logística Univariada N=277					Regressão Logística Multivariada N=277				
		OR	IC 95% para OR		P	R ²	OR	IC 95% para OR		P	*R ²
			Limite inferior	Limite superior				Limite inferior	Limite superior		
Perda de olfato	32,3%	7,5	3,5	16,2	<0,001	0,15	3,1	1,1	9,3	<0,05	0,20
Perda de paladar	30,7%	9,0	3,9	21,2	<0,001	0,16	3,2	0,9	10,7	0,062	
Tonteira	11,8%	6,6	1,8	23,2	<0,01	0,05	4,1	1,1	16,0	<0,05	
Dores no corpo	27,6%	3,0	1,6	5,6	<0,001	0,06					
Diarreia	24,4%	2,4	1,2	4,5	<0,01	0,03					
Cefaleia	46,5%	1,7	1,1	2,7	0,032	0,02					
Febre	9,4%	2,1	0,8	5,6	0,12	0,01					
Tosse seca	27,6%	1,7	1,0	3,0	0,06	0,02					
Outros sintomas	13,4%	2,1	0,9	4,9	0,06	0,02					
Dores nas pernas	11,8%	1,8	0,8	4,3	0,14	0,01					

*R² de Nagelkerke.

Não houve diferença estatística significativa entre os profissionais que desempenhavam suas atividades assistenciais e os profissionais que desempenhavam atividades administrativas quanto à chance de infecção pelo SARS-CoV-2, OR = 1,0 (IC 95% 0,6 - 1,7). Da mesma forma, não houve diferença estatística significativa entre os profissionais que desempenharam atividades assistenciais em áreas de enfrentamento da COVID-19 em comparação com aqueles que exerciam suas atividades administrativas em outras áreas da COVID-19, OR = 1,97 (IC 95% 0,6 - 6,5).

DISCUSSÃO

Poucos são os estudos mundiais que demonstram evidências sorológicas em multiprofissionais envolvidos com a assistência na saúde; mesmo estes, pela proximidade com os pacientes infectados pelo vírus, serem grandes vetores

potenciais para a sua disseminação.⁽²²⁾ No número absoluto de mortes, os Estados Unidos – cujo primeiro óbito foi registrado em 29 de fevereiro –, a Índia e o Brasil chamam atenção, sendo os países mais afetados do mundo também no número de casos.

O Brasil é um dos países mais impactados pela pandemia COVID-19,⁽²³⁾ e o presente estudo demonstrou que 44,2% de uma população representativa de profissionais expostos ao vírus durante um período da pandemia por COVID-19 desenvolveram anticorpos anti-IgG SARS-CoV-2 de forma sintomática (40,5%) ou assintomática (23,7%). Estudo semelhante realizado por Crawford et al.,⁽²⁴⁾ no Reino Unido, demonstrou evidência sorológica em 18% dos profissionais de saúde (115 de 633) que testaram como soropositivos, com taxa de COVID-19 sintomático de 27,5% em comparação com uma taxa assintomática de 15,1%. Hipotetizamos que taxas maiores apresentadas em

nosso estudo podem estar relacionadas com a educação efetiva proposta nos dois países no uso dos equipamentos de proteção individual adequados.

Em relação às associações demográficas de soroprevalência de SARS-CoV-2 entre os profissionais, não foram encontradas relevâncias significativas quanto a idade e sexo, assemelhando-se e confirmando os achados de Patel,⁽²²⁾ com exceção de raça-cor, onde dados encontrados por ele sugerem associação entre variabilidade genética e imunidade inata, embora ainda não haja dados que comprovem a especulação em SARS-CoV-2.

É fato que o número total de casos reais de COVID-19 na instituição é muito maior do que os confirmados, bastando observar o número de participantes que se abstiveram de responder o questionário no que se refere a sinais e sintomas.

A regressão logística multivariada apontou a perda de olfato e a tonteira como fatores preditores para SARS-CoV-2, sintomas altamente subjetivos e contrários à maioria dos estudos publicados. A febre, sintoma importante em processos infecciosos, que na maioria dos estudos publicados apresenta proporção de relevância, como no de Wang et al.,⁽¹⁸⁾ no presente estudo não representou proporção apreciável, o que requer atenção clínica especial.

Segundo o CDC, os testes de triagem têm como objetivo identificar as pessoas infectadas que são assintomáticas e não têm exposição conhecida, suspeita ou relatada ao SARS-CoV-2. A triagem ajuda a identificar casos desconhecidos para que medidas possam ser tomadas para prevenir futuras transmissões. Exemplos de triagem incluem: testar funcionários em um ambiente de trabalho; testar alunos, professores e funcionários em uma escola ou universidade; testar uma pessoa antes ou depois da viagem; teste em casa para alguém que não tem sintomas associados ao COVID-19 e nenhuma exposição conhecida a alguém com COVID-19.⁽²⁵⁾

De acordo com Xavier et al.,⁽²⁶⁾ o uso racional dos marcadores laboratoriais específicos deve respeitar a cronologia da doença, e a interpretação correta pode fornecer subsídios para um melhor manejo dos pacientes acometidos, bem como identificar portadores assintomáticos ou com poucos sintomas. Para vigilância epidemiológica, é necessário coletar amostras clínicas para detecção viral ou resposta imune em larga escala para definir uma situação real dessa doença em todo o mundo.

CONCLUSÃO

A triagem de rotina dos profissionais envolvidos na assistência em saúde deve ser implementada para reduzir a transmissão viral e medidas de segurança devem ser enfatizadas como uso adequado de equipamentos de proteção individual para proteger esses trabalhadores essenciais de futuras ondas pandêmicas.

Nesse contexto, os testes rápidos utilizados em rastreios da infecção por SARS-CoV-2 são uma necessidade urgente, para permitir um plano eficaz e rápido de diagnóstico e para prevenir futuras transmissões. Ainda que os testes rápidos não sejam recomendados como única forma de diagnóstico da doença, observamos ser uma excelente alternativa para a triagem inicial e testagem em massa da população com a qual contamos desde o início da pandemia como ferramenta laboratorial.

Considerando-se a orientação da OMS quanto à necessidade de testagem em massa das populações, a expansão da pandemia e as barreiras atuais à realização de RT-PCR compatível com a demanda, as empresas produtoras de reagentes diagnósticos laboratoriais passaram a desenvolver testes para pesquisa de anticorpos e antígenos relacionados ao vírus. A literatura relacionada à produção de anticorpos (anticorpogênese) frente a um estímulo antigênico evidencia ser esta uma resposta individual. Logo, concluímos em nossos achados que a quantidade de anticorpos formados poderá variar e ocasionar diferentes momentos de detecção destes anticorpos, embora a grande maioria dos trabalhos em infecções por coronavírus assinalam que, por volta do sétimo e oitavo dia, eles já sejam evidenciados, ressaltando, então, que alguns pacientes poderão levar tempo menor ou maior.

Estabelecer estratégias de testagem para COVID-19 é fundamental para o aumento do acesso aos testes para definir a soroprevalência. Cabe notar que uma grande quantidade de novos estudos continua sendo produzida todos os dias e que as recomendações apresentadas estão sujeitas a mudanças conforme vão sendo produzidas novas evidências.

AGRADECIMENTOS

Aos muitos membros da equipe médica, de enfermagem da linha de frente e ao pessoal de laboratório do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle pelo tratamento dispensado a esses pacientes.

Abstract

The seroprevalence of SARS-CoV-2 was determined from a cross-sectional epidemiological survey carried out at the Gaffrée and Guinle University Hospital in the city of Rio de Janeiro, Brazil from October to November 2020 during the COVID-19 pandemic in the population of employees who worked in that period. Sociodemographic characterization was performed in addition to the analysis of associations between the variables of interest or exposure with SARS-CoV-2 infection to establish which signs and symptoms were more prevalent. For the study, blood samples were collected and immunochromatographic assays (COVID-19 IgG/IgM ECO Test® and Medtest® Coronavirus (COVID-19) IgG/IgM) were used to detect IgG and IgM anti-SARS-CoV-2. A sample calculation obtaining 391 health professionals showed that 173 (44.2%) individuals had at least one positive result for SARS-CoV-2 infection. There was no significant difference between the median ages of patients who had SARS-CoV-2 infection (median 40 years, I/Q 34-53) and those who did not have infection (median 39 years, I/Q 32-49), P value = 0.148. There was also no difference between the sex

of professionals with and without SARS-CoV-2 infection (OR = 1.02; 95% CI 0.59 – 1.78). Of the 173 professionals who had SARS-CoV-2 infection, 70 (40.5%) reported symptoms related to COVID-19, while 41 (23.7%) professionals reported that they had no symptoms and 62 (35.8%) did not report on the presence or absence of symptoms, being excluded from the analysis. The symptoms most frequently presented by the infected professionals were: headache 46.5% (59/127); loss of smell 32.3% (41/127); loss of taste 30.7% (39/127); dry cough 27.6% (35/127); diarrhea 24.4% (31/127); body pain 27.6% (35/127); another 13.4% (17/127); leg pain 11.8% (15/127); dizziness 11.8% (15/127) and fever 9.4% (12/127). Establish a surveillance protocol with an easy and quick test for COVID-19 policies among frontline and care professionals is imperative to control the transmission of SARS-CoV-2 and define epidemiological criteria that guide the decision-making regarding the isolation of symptomatic and asymptomatic infected professionals.

Keywords

COVID-19; SARS-CoV-2; Seroprevalence

REFERÊNCIAS

- Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, ST. George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19.
- Pereira D, Costa C, Santos C, Dantas E. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of COVID-19. *Health Biol Sci.* 2020;8(1):1-8; doi: 10.12662/2317-3206jhbs.v8i1. 3297.p1-8.2020.
- Davenne E, Giot Jb, Huynen P. Coronavirus et COVID-19: le point sur une pandémie galopante. *Rev Med Liege.* 2020 Abr; 75(4): 218-225.
- Manrique F, Calderon A, González C, et al. SIR model of the COVID-19 pandemic in Colombia. *Rev Salud Publica* 2020 Jan-Fev; 22(1): 1–9.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. COVID-19: Painel coronavírus. 2020. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 08 de maio de 2021.
- Lanarm, Coelho C, Gomes M, Cruz O, Bastos L, Villela D, et al. Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva. *Cad. Saúde Pública* 2020; 36:e00019620.
- Villela EFM, López, RVM Sato, APS, et al. Surto de COVID-19 no Brasil: adesão às medidas preventivas nacionais e impacto na vida das pessoas. pesquisa online. *BMC Public. Health* 21, 152 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10222-z>
- Feng Y, Ling Y, Bai T, Xie Y, Huang J, Li J, et al. COVID-19 with Different Severities: A Multicenter Study of Clinical Features. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020 Jun 1;201(11):1380-1388. doi: 10.1164/rccm.202002-0445OC. PMID: 32275452; PMCID: PMC7258639.
- World Health Organization (WHO). Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for COVID-19 virus infection. Geneva: WHO; 2020. [acessado 2020 Mar 21]. Disponível em: www.who.int/publications-detail/population-based-age-stratified-seroepidemiological-investigation-protocol-for-covid-19-virus-infection.
- Park S, Cornforth D, Dushoff J, Weitz J. The time scale of asymptomatic transmission affects estimates of epidemic potential in the COVID-19 outbreak. *Epidemics.* 2020; 31:100392. doi: 10.1016/j.epidem.2020.100392.
- Oliveira, Wanderson Kleber de et al. Como o Brasil pode deter a COVID-19. *Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, v. 29, n. 2, e2020044, 2020.*
- Hallal, Pedro Curi et al. Evolução da prevalência de infecção por COVID-19 no Rio Grande do Sul, Brasil: inquéritos sorológicos seriados. *Ciênc. saúde coletiva, Rio de Janeiro, v. 25, supl. 1, p. 2395-2401, jun. 2020.*
- World Health Organization (WHO). Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19. Interim guidance. Reference: WHO/2019-nCoV/lab_testing/2020.1, 21 March 2020.
- Brzostek S, Yang H, Chadburn A, Orlander D, Na A, Thomas R et al. COVID-19 Viral and Serology Testing in New York City Health Care Workers, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 154, Edition 5, November de 2020, páginas 592-595.
- Feroli M, Cisternino C, Leo V, Pisani L, Palange P, Nava. Protegendo profissionais de saúde da infecção por SARS-CoV-2: indicações práticas. *Eur Respir Rev*, 29 (155) (2020), p. 200068.
- Celebi A, & Eroglu Çakmakoglu E. (2020). Nova doença coronavírus 2019 (COVID-19) e desafios em práticas odontológicas. *International Dental Research*, 10 (3), 100-115. <https://doi.org/10.5577/intdentres.2020.vol10.n3.5>
- Sotgiu G, Dobler CC. Social stigma in the time of coronavirus disease 2019. *Eur Respir J* 2020; 56: 2002461 [https://doi.org/10.1183/13993003.02461-2020].
- Wang W, Chen, HE Q. et al. Características clínicas de pacientes internados com doença coronavírus 2019 (COVID-19) na província de Sichuan. *BMC Infect Dis* 21, 155 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05825-1>.
- Pan Y, Li X, Yang G, Fan J, Tang Y, Zhao J, et al. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *J Infect.* 2020.
- Biosciences / Orient Gene Biotech Official Website. O teste rápido de ponto de atendimento COVID-19 IgG / IgM. Disponível online: <https://stocknewsnow.com/companynews/5035338834942348/AYTU/101843> . Acesso em 15 de janeiro de 2021.
- Guedez-López GV, Alguacil-Guillén M, González-Donapetry P, Bloise I, Tornero-Marin C, González-García J, Mingorance J, García-Rodríguez J; SARS-CoV-2 Working Group. Evaluation of three immunochromatographic tests for rapid detection of antibodies against SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Dec;39(12):2289-2297. doi: 10.1007/s10096-020-04010-7. Epub 2020 Aug 17. PMID: 32808111; PMCID: PMC7431115.
- Patel M, Meera N, Pirozzoli E, Cienfuegos M, Aitken E. Prevalência e fatores sociodemográficos do anticorpo SARS-CoV-2 em profissionais de saúde multiétnicos. *Clinical Medicine Jan* 2021, 21 (1) e5-e8; doi: 10.7861 / clinmed.2020-0619.
- Orellana Y, et al. Excess deaths during the COVID-19 pandemic: underreporting and regional inequalities in Brazil. *Cad. Saúde Pública*; 37(1): e00259120, 2021.
- Crawford Forrest W, Jones S, Cartter M, Dean SG, Warren JL, Li, Z, et al. (2021) Impact of close interpersonal contact on COVID-19 incidence: evidence from one year of mobile device data. Submitted.
- CDC. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>.
- Xavier, Ana Lúcia R. et al. COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na nova infecção por coronavírus. *J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro, v. 56, e3232020, 2020.*

Correspondência

Mauricea Francisco da Silva Romero Gonzalez
Hospital Universitário Gaffrée e Guinle - UNIRIO/EBSERH
Rua Mariz e Barros, 775 - Maracanã,
Rio de Janeiro - RJ, 20270-004
E-mail: mauricea.romero@gmail.com

Alternative workflow for COVID-19 diagnosis using direct RT-PCR screening

Fluxo de trabalho alternativo para diagnóstico da COVID-19 utilizando triagem por RT-PCR direta

Wallace Felipe Blohem Pessoa¹

Bruno Henrique Andrade Galvão¹

Haline Barroso²

Eduardo Sergio Soares Sousa¹

Eloiza Helena Campana¹

Marília Gabriela dos Santos Cavalcante¹

Naiara Naiana Dejani¹

Vinícius Pietta Perez¹

Abstract

Objective: COVID-19 is presently the most serious public health concern and diagnosis is a principal tool for controlling and monitoring the spread of the disease. This study aimed to evaluate the efficiency of direct RT-PCR (dRT-PCR) for detection of SARS-CoV-2. **Methods:** Twenty-seven nasopharyngeal swabs from symptomatic individuals were evaluated. Standard RT-PCR was conducted, and for dRT-PCR the samples were preheated before amplification. **Results:** Positive agreement was 63.2% and negative agreement was 100%, being moderately in accord. **Conclusion:** dRT-PCR may be an alternative for screening symptomatic patients and a reliable option during an eventual shortage of viral RNA purification kits.

Keywords

Virology; Molecular Diagnostic Techniques; Polymerase Chain

INTRODUCTION

Since the first report of SARS-CoV-2, the public health laboratories have worked to develop and validate molecular assays to detect the causative agent of COVID-19.⁽¹⁾ Considered the most effective test for diagnosis in symptomatic individuals, reverse transcriptase PCR (RT-PCR) can help to track positive cases and guide health agents to evaluate potential epidemiological situations.⁽²⁾ Considering that the vaccines are not yet available for the majority of the population and the lack of effective treatments, detecting the virus and isolating the infected people is the principal tool available to reduce transmission.⁽³⁻⁴⁾ The worldwide COVID-19 infection has passed 105,764,730 cases, Brazil is the third country with highest number of accumulated cases (9,497,795) and the second highest cumulative number of deaths,⁽⁵⁾ and has limited access to molecular diagnosis. This is due to few resources and lacking health care policies. Indeed, the pandemic presents diagnostic-supply shortages, notably in developing countries.

Thus, we aimed to evaluate and validate the performance of direct RT-PCR (dRT-PCR) as an alternative method to screening COVID-19 during the pandemic.

MATERIAL AND METHODS

Our study included fifty samples (nasopharyngeal swabs) randomly selected from symptomatic individuals at the LaBiMol/CCM/UFPB Laboratory. These were stored in phosphate buffered saline (PBS) at -70°C for COVID-19 testing. According to the BioGene viral DNA/RNA kit (Quibasa, Brazil) manufacturer's instructions the RNA was extracted using a final elution of 60 µL of DNase/RNase free water. For direct dRT-PCR each sample was inactivated at 95°C for 10 minutes, placed in an ice-bath, and immediately conducted to RT-PCR. Amplification for the SARS-CoV-2 E gene, and human RNase P was performed according to instructions, using the SARS-CoV-2 kit (E) (Bio-Manguinhos, Brazil). For dRT-PCR, 2 µL of inactivated samples were used, and DMSO added at 2% to complete the final concentration.

¹ Doutor. Universidade Federal da Paraíba (UFPB). João Pessoa, PB, Brasil.

² Mestre. Laboratório Central de Saúde Pública da Paraíba (UFPB). João Pessoa, PB, Brasil.

Suporte Financeiro: The study received financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (003/2020-FAPESQ/SEECT). **Acknowledgements:** To Laboratório Central de Saúde Pública do Estado da Paraíba - LACEN/PB, particularly to Dalane Loudal for assistance.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202102128

Reactions were amplified using the QuantStudio3 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA), and the virus was considered: detectable when the cycle threshold (Ct) < 40 for the E gene, undetectable when Ct > 40 for the E gene and Ct < 35 for RNase P, and undetermined when Ct > 40 for the E gene and Ct > 35 for RNase P. Results were analyzed statistically, where cycle thresholds were compared using T-test, and concordance in percentage was calculated, Kappa coefficient was used to measure the rate of agreement. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. All analyses were performed using IBM SPSS version 20.0 for macOS (IBM Corporation, USA).

ETHICS

This research was approved by the Ethics Committee (30658920.4.0000.0008).

RESULTS

Standard RT-PCR detected the presence of SARS-CoV-2 in 62% of samples (31/50) dRT-PCR detected the virus in 40% (20/50) of these same samples. For both methodologies, all reactions were considered valid and no reactions were undetermined. Concordance between methodologies was 78% (39/50) with moderate agreement (Kappa 0.580 $\pm$ 0.101, $P = 0.001$). For dRT-PCR, the positive agreement was 64.5% and negative agreement was 100%. The average Ct detected by dRT-PCR was higher than the average Ct detected by RT-PCR. For RNase P the values were 26.6 $\pm$ 2.8 *versus* 29.3 $\pm$ 2.6, and for the E gene the values were 21.7 $\pm$ 6.3 *versus* 27.3 $\pm$ 6.2. When comparing the average Ct for the E gene using standard RT-PCR, agreement for the samples observed was at 21.7 $\pm$ 6.3, disagreement was at *versus* 33.8 $\pm$ 3.6 (Chart 1).

Using a serial dilution of clinical samples, the lowest limit detection was established. The relative limit of detection (RLOD) for standard RT-PCR was 10^{-5} and for direct RT-PCR was 10^{-4} (Table 1).

DISCUSSION

The primer-probe set for the E gene described by Corman et al.⁽¹⁾ is one of the most widely used in Brazilian public health laboratories, with a limit of detection estimated at 3.9 copies per reaction. Several different primer-probe sets are described for detection of SARS-CoV-2, and all have been found to be highly specific with no cross reactions in samples of patients infected with other respiratory viruses. However, the calculated sensitivity is different between primer-probe sets, and assays using the same E gene set evaluated in our study displayed increased sensitivity, thus they are able to reliably detect the viral genome in samples containing 6.3 viral copies and an average Ct of 37.2 ($\pm$ 1.34).⁽⁶⁾

Purification of viral RNA, manually by spin-column, with subsequent amplification using SARS-CoV-2 kit (E) is a time-consuming process. Due to eventual shortage of RNA purification kits, we evaluated a quick alternative dRT-PCR which resulted in perfect negative concordance, and a moderate positive concordance when using the standard procedure. In Denmark, a study with a similar methodology observed sensitivities from 89.5% to 92%, with specificity at 100%, with a mean Ct increment of from +1.4 to +1.9 for dRT-PCR using both the same primer-probe set and the sample inactivation procedure described in our study.⁽⁷⁾

For sample collection, PBS is a viable alternative for transport,⁽⁸⁾ but the sensitivity of dRT-PCR might be more affected than standard RT-PCR by the medium used. In Canada, it has been reported that samples stored in a balanced salt solution medium presented a positive agreement of 69% and increased inhibition of the PCR reaction. Employing our methodology of samples stored in PBS, we observed a similar positive agreement of 63.2%, but unlike the results of Merindol et al.⁽⁹⁾ no increase in reactions, which did not amplify the internal control. Another study, conducted in Spain, achieved similar results, and all samples amplified the internal control.⁽¹⁰⁾ A plausible explanation is the reduced volume used in ours and the Spanish study, which diluted the PCR inhibitors present in the raw samples.

Table 1 - Relative Limit of Detection (RLOD) for standard RT-PCR and direct RT-PCR methods for E gene.

	Standard RT-PCR				RLOD	direct RT-PCR				RLOD
Concentration	10^2	10^3	10^4	10^5	10^5	10^2	10^3	10^4	10^5	10^4
Pos./total	5/5	5/5	5/5	5/5		5/5	5/5	5/5	1/5	
Mean Ct	23.52	26.62	31.14	34.62		28.16	32.34	35.44	37.1	
Std. Deviation	0.89	1.48	0.28	0.43		0.89	0.46	0.71		

*Concentration is presented in a serial dilution of clinical samples. The observed Relative Limit of Detection (RLOD) is the lowest concentration where all replicates detect E gene.

Chart 1. Comparative results of standard RT-PCR versus direct RT-PCR for 50 samples included in this study

Sample	Standard RT-PCR			direct RT-PCR		
	RNAseP (Ct)	E (Ct)	RESULT	RNAseP (Ct)	E (Ct)	RESULT
1	23	24	DET	23	28	DET
2	25	un.	UN.	24	un.	UN.
3	25	35	DET	26	un.	UN.
4	26	16	DET	38	20	DET
5	27	17	DET	29	21	DET
6	27	21	DET	29	16	DET
7	27	21	DET	29	30	DET
8	28	un.	UN.	28	un.	UN.
9	28	15	DET	30	21	DET
10	28	31	DET	30	36	DET
11	28	33	DET	28	un.	UN.
12	29	un.	UN.	30	un.	UN.
13	29	un.	UN.	30	un.	UN.
14	29	23	DET	29	29	DET
15	29	30	DET	29	un.	UN.
16	29	un.	UN.	30	un.	UN.
17	29	21	DET	30	26	DET
18	29	36	DET	30	un.	UN.
19	29	35	DET	29	un.	UN.
20	29	un.	UN.	31	un.	UN.
21	30	34	DET	30	un.	UN.
22	30	un.	UN.	30	un.	UN.
23	30	16	DET	30	22	DET
24	31	37	DET	33	un.	UN.
25	31	un.	UN.	33	un.	UN.
26	32	25	DET	32	21	DET
27	32	20	DET	32	31	DET
28	23	24	DET	28	31	DET
29	25	25	DET	30	un.	UN.
30	23	16	DET	26	29	DET
31	23	17	DET	28	27	DET
32	24	18	DET	29	23	DET
33	27	17	DET	33	26	DET
34	27	un.	UN.	31	un.	UN.
35	24	un.	UN.	27	un.	UN.
36	24	un.	UN.	30	un.	UN.
37	24	un.	UN.	27	un.	UN.
38	25	36	DET	28	38	DET
39	23	un.	UN.	26	un.	UN.
40	21	un.	UN.	27	un.	UN.
41	23	un.	UN.	26	un.	UN.
42	26	36	DET	25	38	DET
43	21	un.	UN.	29	un.	UN.
44	26	un.	UN.	28	un.	UN.
45	26	35	DET	32	un.	UN.
46	26	38	DET	32	un.	UN.
47	25	34	DET	30	un.	UN.
48	25	un.	UN.	31	un.	UN.
49	25	21	DET	28	33	DET
50	23	un.	UN.	33	un.	UN.
Mean Ct (S.D.)	26.6 (2.8)	26.0 (8.0)		29.3 (2.6)	27.3 (6.2)	
Paired mean Ct (S.D.)		21.7 (6.3)				

Ct = Cycle threshold. DET = Detectable, dRT-PCR = direct RT-PCR. UN = undetectable

Due to dilution or to the modified transport media our alternative dRT-PCR resulted in an increased Ct for the E gene (+4.2) and discrepant samples between standard RT-PCR and dRT-PCR presented high average Ct using standard RT-PCR (an average of 35.2). Thus, we may assume that the false negatives encountered using dRT-PCR were related to low viral load.

Other fast and inexpensive alternatives to RNA extraction from nasopharyngeal swabs have also been evaluated. In Hong Kong, samples stored in viral transport medium were heat inactivated, whether preceded or not, by treatment with proteinase K. When pre-treated, an increase in the dRT-PCR detection rate was observed.⁽¹¹⁾ We also evaluated the use of proteinase K; however, the rate of undetermined reactions was excessively high (data not shown), which suggests that dRT-PCR performance can be affected by many factors.

When comparing the available studies, one may observe that under different protocols, results are not reproduced, and not all RT-PCR kits are compatible with simplified sample heat-processing. The use of dRT-PCR should only be chosen upon proper validation.

The lack of extraction reduces turnaround time for COVID-19 diagnosis, thus allowing prompt decision making regarding isolation of infected patients. However due to the inferior sensitivity of dRT-PCR, it is proposed that dRT-PCR may be used for screening. To optimize time, and consumption of reagents, screening could be performed for the E gene alone, without an internal control (RNase P); and samples presenting Ct ≥ 40 be submitted for RNA extraction/purification and standard RT-PCR.

To evaluate the technical convenience of the proposed method, total time per run and sample quantity, according to the prevalence observed in our laboratory, were calculated. Using the proposed method resulted in decreased time to detect the virus, yielding results in 2 hours and 20 minutes for 23.3% to 44.4% of samples, and in 8 hours and 20 minutes for 55.6% to 76.7% of samples.

CONCLUSION

In a sample population with high prevalence, we have demonstrated that dRT-PCR may be used for screening in molecular diagnosis of COVID-19, resulting in reduced RNA viral extraction kit consumption and shortened execution times. The proposed workflow represents a viable alternative towards avoiding RNA purification kit shortages in public health laboratories.

Resumo

Objetivo: A COVID-19 é atualmente um sério problema de saúde pública e o diagnóstico é a principal ferramenta para controlar e monitorar a propagação da doença. Este estudo teve como objetivo

avaliar a eficiência da RT-PCR direta (dRT-PCR) para detecção do SARS-CoV-2. **Métodos:** Vinte e sete amostras de swab nasofaríngeo de indivíduos sintomáticos foram avaliadas. A RT-PCR padrão foi realizada e para a dRT-PCR as amostras foram pré-aquecidas antes da amplificação. **Resultados:** A concordância positiva foi de 63,2% e a concordância negativa foi de 100%, sendo moderadamente concordante. **Conclusão:** A dRT-PCR pode ser uma alternativa para a triagem de pacientes sintomáticos e uma opção confiável durante uma eventual escassez de kits de purificação de RNA viral.

Palavras-chave:

Virologia; Triagem; Técnicas de Diagnóstico Molecular; Reação em Cadeia da Polimerase

REFERENCES

1. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020 Jan;25(3):2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
2. Nörz D, Fischer N, Schultze A, Kluge S, Mayer-Runge U, Aepfelbacher M, Pfefferle S, Lütgehetmann M. Clinical evaluation of a SARS-CoV-2 RT-PCR assay on a fully automated system for rapid on-demand testing in the hospital setting. *J Clin Virol.* 2020 Jul;128:104390. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104390.
3. Zhang LP, Wang M, Wang Y, Zhu J, Zhang N. Focus on the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Future Microbiol.* 2020 Jul;15:905-918. doi: 10.2217/fmb-2020-0063.
4. WHO. World Health Organization. Considerations for quarantine of individuals in the context of containment for coronavirus disease (COVID-19). Switzerland: World Health Organization [updated 2020 March 19; cited 2020 July 27]. Available from: [https://www.who.int/publications/i/item/considerations-for-quarantine-of-individuals-in-the-context-of-containment-for-coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications/i/item/considerations-for-quarantine-of-individuals-in-the-context-of-containment-for-coronavirus-disease-(covid-19))
5. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Especial. Semana Epidemiológica 5 (31/1 a 6/2/2021) [internet]. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença pelo Coronavírus COVID-19. [acesso em março 2021] Disponível em: https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/fevereiro/13/boletim_epidemiologico_covid_49_13fev21.pdf
6. Nalla AK, Casto AM, Huang MW, Perchetti GA, Sampoleo R, Shrestha L, Wei Y, Zhu H, Jerome KR, Greninger AL. Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays Using Seven Different Primer-Probe Sets and One Assay Kit. *J Clin Microbiol.* 2020 May 26;58(6):e00557-20. doi: 10.1128/JCM.00557-20.
7. Fomsgaard AS, Rosenstjerne MW. An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 - escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020. doi: 10.2807/1560-7917.
8. Rodino KG, Espy MJ, Buckwalter SP, Walchak RC, Germer JJ, Fernholz E, Boerger A, Schuetz AN, Yao JD, Binnicker MJ. Evaluation of Saline, Phosphate-Buffered Saline, and Minimum Essential Medium as Potential Alternatives to Viral Transport Media for SARS-CoV-2 Testing. *J Clin Microbiol.* 2020 May 26;58(6):e00590-20. doi: 10.1128/JCM.00590-20.
9. Merindol N, Pépin G, Marchand C, Rheault M, Peterson C, Poirier A, Houle C, Germain H, Danylo A. SARS-CoV-2 detection by direct rRT-PCR without RNA extraction. *J Clin Virol.* 2020 Jul;128:104423. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104423.
10. Alcoba-Florez J, González-Montelongo R, Íñigo-Campos A, de Arto DG, Gil-Campesino H, The Microbiology Technical Support Team, Ciuffreda L, Valenzuela-Fernández A, Flores C. Fast SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR in preheated nasopharyngeal swab samples. *Int J Infect Dis.* 2020 Aug;97:66-68. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.099.

11. Chu AW, Chan WM, Ip JD, Yip CC, Chan JF, Yuen KY, To KK. Evaluation of simple nucleic acid extraction methods for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal and saliva specimens during global shortage of extraction kits. J Clin Virol. 2020 Aug;129:104519. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104519.

Correspondência

Wallace Felipe Blohem Pessoa
Centro de Ciências da Saúde,
Departamento de Fisiologia e Patologia,
Campos I, Cidade Universitária,
Universidade Federal da Paraíba-UFPB
E-mail: wallace@ccs.ufpb.br

Hemácias pinçadas ou em forma de cogumelo em um paciente acometido por COVID-19

Pincer cells or mushroom-shaped red blood cells in a patient affected by COVID-19

Guilherme Dienstmann¹

Vitor Barbosa dos Santos²

Samuel Ricardo Comar³

Resumo

Desde o primeiro caso de COVID-19, ocorrido na China em dezembro de 2019, o espectro da doença tem se mostrado muito amplo, incluindo uma miríade de manifestações hematológicas. Relatamos aqui o caso de um paciente com diagnóstico confirmado de COVID-19, o qual apresentou, no sangue periférico, a presença de hemácias apresentando projeções citoplasmáticas, semelhantes a uma célula pinçada (*pincer cells*), também conhecidas como hemácias em forma de cogumelo (*mushroom-shaped red blood cells*).

Palavras-chave

COVID-19; SARS-CoV-2; célula pinçada; hemácias em forma de cogumelo

INTRODUÇÃO

Desde o primeiro caso de COVID-19, ocorrido na pandemia pelo novo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave-2 (SARS-CoV-2), na cidade de Wuhan, província de Hubei, República Popular da China, em dezembro de 2019, o espectro da doença tem se mostrado muito amplo, incluindo uma miríade de manifestações hematológicas.⁽¹⁾ Relatamos aqui as características distintas do sangue periférico de um paciente com diagnóstico confirmado de COVID-19, que fazem parte desse universo de manifestações.

CASO CLÍNICO

Paciente masculino, 37 anos, nefropata crônico, hipertenso, em tratamento com hidralazina, anlodipina, atenolol, valsartan, alopurinol, trezor e sem histórico prévio de doenças eritrocitárias genéticas. O PCR para SARS-CoV-2 foi positivo. Apresentou sintomas gripais e tosse para os quais não foi recomendada a necessidade de internação. Após 14 dias de isolamento em casa, realizou um hemograma e outros exames bioquímicos, os quais apresentaram os resultados, conforme o Quadro 1.

Na lâmina, que foi realizada imediatamente após a coleta, sem a adição de anticoagulantes e corada pela

coloração de May-Grunwald Giemsa, foi observada a presença de hemácias apresentando projeções citoplasmáticas, semelhantes a uma célula pinçada (*pincer cells*), também conhecidas como hemácias em forma de cogumelo (*mushroom-shaped red blood cells*), conforme Figura 1.

DISCUSSÃO

Segundo o ICSH (*International Council for Standardization in Haematology*),⁽²⁾ as *pincer cells* são classificadas como sinônimo de esquistócitos (fragmentos eritrocitários) e são normalmente associadas a transtornos eritrocitários, como anemias diseritropoiéticas congênitas, esferocitose hereditária associada à deficiência de proteína Banda-3, coagulação intravascular disseminada, síndrome hemolítico-urêmica, púrpura trombocitopênica trombótica, doença renal, anemia hemolítica microangiopática, eritroleucemia e, mais raramente, em hemólise induzida por drogas oxidantes.^(3,4)

No entanto, um estudo recente demonstrou uma provável relação entre o surgimento de *pincer cells* e a infecção causada pelo SARS-CoV-2 em um mecanismo fisiopatológico que possivelmente envolveria a ocorrência de estresse oxidativo, que desencadearia uma cascata progressiva de inflamação, conhecida como tempestade de citocinas, provocando danos nas membranas celulares

¹ Sociedade Educacional de Santa Catarina – UNISOCIESC. Joinville (SC), Brasil. E-mail: guidbio@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5360-2302>.

² Laboratório Coser. Nova Venécia (ES), Brasil. E-mail: vitorfarmaceutico@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7905-7605>.

³ Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba (PR), Brasil. E-mail: srcomar@ufpr.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4632-1593>.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.20210002

das hemácias, resultando em hemólise oxidativa.⁽⁵⁾ Por outro lado, outro estudo sugeriu que as *pincer cells* podem também ser formadas como resultado de uma possível trombose microvascular, particularmente nos pulmões, mas também em outros órgãos como os rins, onde a sua formação seria indicativa de dano microangiopático aos glóbulos vermelhos.⁽⁶⁾

Mesmo compreendendo que estudos futuros são necessários para melhor clareza deste processo fisiopatológico,

especialmente para investigarmos o papel potencial deste tipo de poiquilócito no diagnóstico diferencial de anemias e na avaliação de risco de doenças relacionadas, reforçamos a necessidade de nos atualizarmos morfológicamente em relação às características microscópicas das *pincer cells* a fim de que possamos reportá-las com segurança, quando presentes, uma vez que podem estar associadas não só à COVID-19, como também a várias outras condições clínicas importantes.

Quadro 1 - Resultados laboratoriais do paciente.

RESUMO DO HEMOGRAMA		
Parâmetro	Resultado	Valor de Referência
Hemácias	$3,51 \times 10^6/\mu\text{L}$	$4,00 - 5,90 \times 10^6/\mu\text{L}$
Hemoglobina	10,1 g/dL	12,0 – 17,5 g/dL
Volume globular	30,6%	35,0 – 53,0%
Leucócitos	$11,06 \times 10^3/\mu\text{L}$	$4,00 - 11,00 \times 10^3/\mu\text{L}$
Neutrófilos	66%	40 – 70%
Bastonetes	5%	0 – 8%
Metamielócitos	1%	0
Linfócitos	23%	20 – 45%
Monócitos	5%	2 – 10%
Plaquetas	244.000/ μL	140.000 – 400.000/ μL
EXAMES BIOQUÍMICOS		
Creatinina	4,94 mg/dL	0,70 – 1,25 mg/dL
Uréia	170 mg/dL	15 – 45 mg/dL
Proteína C reativa	5,2 mg/L	< 5,0 mg/L

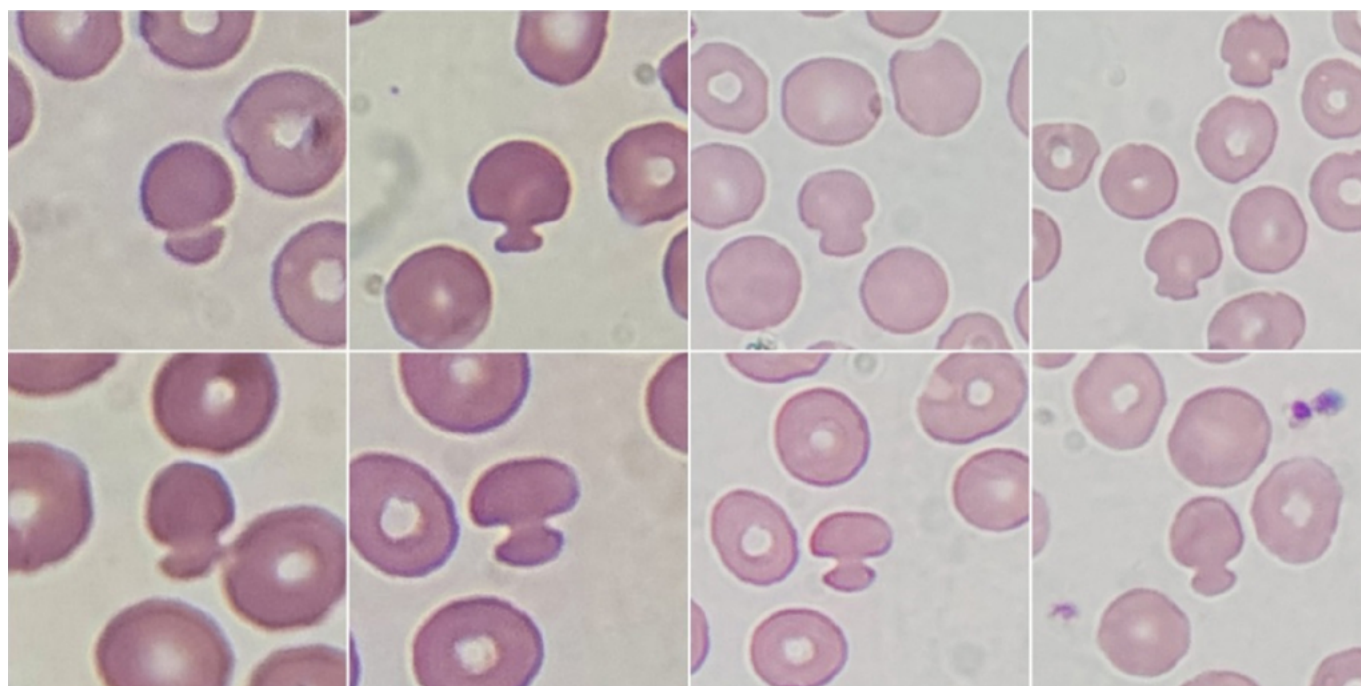


Figura 1. Hemácias em forma de cogumelo (*pincer cells*, mushroom-shaped red blood cells). Magnificação de 1000x. Coloração de May Grünwald & Giensa.

Abstract

Since the first case of COVID-19, which occurred in China in December 2019, the spectrum of the disease has been very broad, including a myriad of hematological manifestations. We report here the case of a patient with a confirmed diagnosis of COVID-19, who presented, in peripheral blood, the red blood cells with cytoplasmic projections, similar to a pincer cells, also known as mushroom-shaped red blood cells.

Keywords

COVID-19; SARS-CoV-2; pincer cells; mushroom-shaped red blood cells

REFERÊNCIAS

1. Crossette-Thambiah C, Hazarika B, Bain BJ. Covid-19 and acute kidney injury. *Am J Hematol.* 2021;1-2.
2. Palmer L, Briggs C, McFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, Proytcheva M, Machin SJ. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol.* 2015;37(3):287-303.
3. Lesesve JF. Mushroom-shaped red blood cells in protein band-3 deficiency. *Am J Hematol.* 2011;86(8):694.
4. McCann SR, Firth R, Murray N, Temperley IJ. Congenital dyserythropoietic anaemia type II (HEMPAS): a family study. *J Clin Pathol.* 1980;33(12):1197-201.
5. Gérard D, Ben Brahim S, Lesesve JF, Perrin J. Are mushroom-shaped erythrocytes an indicator of COVID-19? *Br J Haematol.* 2021;192(2):230.
6. Jhaveri KD, Meir LR, Chang BS, et al. Thrombotic microangiopathy in a patient with COVID-19. *Kidney Int.* 2020;98:509-512.

Correspondência

Guilherme Dienstmann

Rua João Alexandre de França, 349

CEP: 89225-140, Joinville (SC), Brasil

E-mail: guidbio@gmail.com

Tecnologia do DNA Recombinante

Recombinant DNA Technology

Maria Elizabeth Menezes¹

Prezado Editor,

Os recentes avanços no diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2, causador da COVID-19, e o rápido desenvolvimento de vacinas anti-SARS-CoV-2, devem-se à Tecnologia do DNA Recombinante (TDR), que na década de 1980 revolucionou o diagnóstico laboratorial viral, com o desenvolvimento de um método de amplificação, *in vitro*, de material genético, chamado de reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi originalmente desenvolvida em 1983 por Kary Mullis, pesquisador americano que recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1993 por seu trabalho pioneiro. A PCR é usada em biologia molecular para fazer muitas cópias (amplificar) de pequenas seções de DNA. Usando a PCR, é possível gerar de milhares a milhões de cópias de uma seção específica de DNA a partir de uma quantidade muito pequena de DNA. A PCR tornou-se uma ferramenta comum usada em laboratórios de pesquisa médica e biológica. É usada nos estágios iniciais do processamento de DNA para sequenciamento, para detectar a presença ou ausência de um gene para ajudar a identificar patógenos durante a infecção e na geração de perfis forenses de DNA a partir de pequenas amostras de DNA.

A TDR tornou possível um tipo de genética chamada genética reversa. Tradicionalmente, a pesquisa genética começa com um fenótipo mutante e, pela análise de cruzamento mendeliano, um pesquisador é capaz de atribuir o fenótipo a um gene específico. A genética reversa viaja precisamente na direção oposta, onde os pesquisadores começam com um gene de função desconhecida e usam a análise molecular para determinar seu fenótipo. Ela ofereceu novas oportunidades para criação e inovação na produção de grande variedade de produtos terapêuticos com efeito imediato na genética médica e na medicina, modificando microrganismos, animais e plantas para produzir

medicamentos úteis. A maioria dos produtos farmacêuticos biotecnológicos são de natureza recombinante e desempenha um papel fundamental contra doenças letais humanas. Os produtos farmacêuticos sintetizados por meio desta tecnologia mudaram completamente a vida humana, de tal forma que levou a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA a aprovar mais medicamentos recombinantes no ano de 1997 do que nos anos anteriores combinados.

A gama de medicamentos recombinantes tiveram como alvo uma série de patologias associadas, incluindo anemia, AIDS, câncer (Sarcoma de Kaposi, leucemia e câncer colorretal, renal e de ovário), doenças hereditárias (fibrose cística, hipercolesterolemia familiar, doença de Gaucher, hemofilia A, doença de imunodeficiência combinada grave), úlceras de pé diabético, difteria, verrugas genitais, hepatite B, hepatite C, hormônio de crescimento humano, entre outros produtos. No ramo da terapêutica esta tecnologia possibilitou o desenvolvimento do tratamento para o distúrbio de leucemia, em uma parceria entre a Novartis Corp e a Universidade da Pensilvânia.

A tecnologia do DNA recombinante também permitiu um grande salto nos processos biotecnológicos de uma forma geral, seja na produção destes compostos chamados recombinantes ou no desenvolvimento de diversas técnicas que se espalham hoje da medicina até a agricultura, trazendo avanços e agregando uma série de vantagens comerciais, gerando conhecimento e tendo à sua frente um campo de oportunidades aberto. Em termos biotecnológicos ganham destaques os campos da imunologia aplicada, da genômica, as ferramentas de diagnóstico, a criação de desenvolvimento de terapêutica farmacêutica e a crescente adoção de safras geneticamente modificadas e biopesticidas. Por tudo isso que foi mencionado, somado com a necessidade crescente de melhorar a capacidade de produção de proteína recombinante e a presença de um mercado enorme para consumo de biofármacos, é possível concluir que ocorre um grande aumento na demanda por processos terapêuticos eficazes no tratamento de uma gama de doenças que acometem o ser humano. Desta forma, existem vastas oportunidades

¹ DNA Análises Laboratório. Florianópolis-SC, Brasil

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100967

para as empresas e prestadores de serviços tornarem os testes acessíveis e entrar em regiões inexploradas do mundo com um grande escopo de expansão. O mercado global de tecnologia de DNA recombinante deve crescer a uma taxa de aproximadamente 6,9% durante o período de 2017–2023.

BIBLIOGRAFIA

- ANVISA, Definição de Medicamentos Biológicos. Disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/medicamentos/conceitos-e-definicoes>. Acesso em 15 de Abril de 2021.
- NIH - National Human Genome Research Institute. Disponível em <https://www.genome.gov>. Acesso em 09 de Dezembro de 2020.
- Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. Int J Genomics. 2016; 2016: 2405954. Suliman Khan, Muhammad Wajid Ullah, Rabeea Siddique, Ghulam Nabi, Sehrish, Manan, Muhammad Yousaf and Hongwei Hou. Published online 2016 Dec 8. doi: 10.1155/2016/2405954

Correspondência

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

Uso indiscriminado de antibióticos durante a pandemia: o aumento da resistência bacteriana pós-COVID-19

Indiscriminate use of antibiotics during the pandemic: increasing in post-COVID-19 bacterial resistance

Lillian O. P. Silva¹

Joseli M. R. Nogueira²

Prezado editor,

A resistência bacteriana é um grave problema de saúde pública mundialmente negligenciado que vem sendo estudado há mais de dez anos, pois é capaz de causar milhares de mortes por ano. Em consonância, a preocupação atual com esse tema se amplia devido ao uso indiscriminado dos antibióticos durante a pandemia da COVID-19, que vem sendo tratada muitas vezes com antimicrobianos.^(1,2) Contudo, a infecção é oriunda da presença do novo Coronavírus, SARS-CoV-2, um RNA-vírus zoonótico, de fita simples, descoberto no final de 2019 após um surto de pneumonia desconhecida em Wuhan, na China.^(3,4) Tal sintoma foi responsável por justificar o uso dos antibióticos no tratamento da doença, mesmo sem a confirmação de coinfeção bacteriana, uma vez que os sintomas são semelhantes às pneumonias bacterianas.⁽⁵⁾ É válido ressaltar que a terapia antimicrobiana está sendo aplicada não só pela comunidade médica, no ambiente hospitalar, mesmo sem o embasamento científico de sua eficácia no tratamento da COVID-19, mas também pela população leiga que faz uso da automedicação, que é amplamente estimulada pelas *Fake News*, notícias falsas que circulam pela mídia e redes sociais de forma geral, e pelas indicações de diversos profissionais, sejam eles da área da saúde ou não.⁽⁶⁾

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), apenas 15% dos infectados pelo SARS-CoV-2 desenvolvem uma coinfeção bacteriana que justifica o uso da antibioticoterapia.⁽⁷⁾ Outros estudos afirmam que os antibióticos foram prescritos em cerca de 59% dos casos de internação por COVID-19, independentemente da presença de infecção bacteriana, o que, mediante a capacidade de

adaptação e produção de mecanismos de resistência destes microrganismos, embasa a preocupação dos profissionais de saúde quanto ao aumento da ameaça de uma nova pandemia, desta vez causada por bactérias pan-resistentes, ou seja, resistentes a todas as classes de antimicrobianos disponíveis no mercado.⁽⁸⁾

O uso indiscriminado desses fármacos apresenta um risco iminente à saúde pública mundial, pois, a partir do momento em que não haverá tratamento farmacológico disponível para os pacientes infectados por bactérias pan-resistentes, também conhecidas popularmente como “superbactérias”, ocorrerá um possível colapso dos hospitais, sejam eles públicos ou privados, devido ao aumento do número de leitos ocupados e, consequentemente, de óbitos relacionados.^(9,10)

Ainda que o impacto da COVID-19 no futuro da humanidade não esteja totalmente elucidado, a perspectiva da crise sanitária relacionada às bactérias resistentes é real e precisa receber a devida atenção para que possamos, desde já, tentar contornar a situação através do controle de prescrições e dispensação dos antibióticos.

REFERÊNCIAS

1. Oliveira AC, et al. Infecções hospitalares: Abordagem, Prevenção e Controle. Medsi, Rio de Janeiro, 1998.
2. OPAS/OMS BRASIL. Novo relatório pede ação urgente para evitar crise de resistência antimicrobiana. 2019. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5922:no-vo-relatorio-pede-acao-urgente-para-evitar-crise-de-resistencia-antimicrobiana&Itemid=812. Acesso em: 20 mai. 2021.
3. Uzunian A. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 56, 2020.
4. Wang X et al. Nosocomial outbreak of COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. *European Respiratory Journal*, v. 55, n. 6, 2020.
5. Huttner B, et al. COVID-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles! *Clinical Microbiology and Infection*, v. 26, n. 7, p. 808-810, 2020.
6. Guimarães AS, Carvalho WRG. Desinformação, Negacionismo e Automedicação: a relação da população com as drogas “milagrosas” em meio à pandemia da COVID-19. *Interamerican Journal of Medicine and Health*, v. 3, 2020.

¹ Mestranda do PPGSPMA - Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ – Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

² Chefe do Laboratório de Microbiologia – DCB - Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ – Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100963

7. WHO. Preventing the COVID-19 pandemic from causing an antibiotic resistance catastrophe. World Health Organization, Europa, v. 1, n. 1, p. 1-1, nov./2020. Disponível em: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/news/news/2020/11/preventing-the-covid-19-pandemic-from-causing-an-antibiotic-resistance-catastrophe>. Acesso em: 20 mai. 2021.
8. Wei W et al. Limited Role for Antibiotics in COVID-19: Scarce Evidence of Bacterial Coinfection, Disponível em SSRN 3622388, 2020.
9. Miranda C et al. Implications of antibiotics use during the COVID-19 pandemic: present and future. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 75, n. 12, p. 3413- 3416, 2020.
10. Vellano PO, Paiva MJM. O uso de antimicrobiano na COVID-19 e as infecções: o que sabemos. Research, Society and Development, v. 9, n. 9, p. e841997245-e841997245, 2020.

Correspondência

Joseli Maria da Rocha Nogueira
Laboratório de Microbiologia
Departamento de Ciências Biológicas
Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Manguinhos
Rio de Janeiro-RJ, Brasil
E-mail: joselimaria@gmail.com

O impacto da COVID-19 na malária

The impact of COVID-19 on malaria

Ricardo Luiz Dantas Machado¹

Prezado Editor,

A malária é considerada um importante problema de saúde pública com impactos na economia e na sociedade de países onde a doença é endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. É uma doença infecciosa cuja transmissão ocorre durante a ingestão de sangue dos vetores no hospedeiro vertebrado, quando inoculam formas evolutivas do parasito que, pela via circulatória, invadem os hepatócitos e posteriormente as hemácias. A aquisição das formas infecciosas do vetor advém de indivíduos doentes ou portadores assintomáticos.⁽¹⁾

O protozoário responsável pela malária é do gênero *Plasmodium*, pertencente ao filo Apicomplexa e à família *Plasmodiidae*. Atualmente, são conhecidas cerca de 170 espécies que causam a doença em diferentes hospedeiros vertebrados; destes, apenas cinco parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. No Brasil, não há registros da transmissão nativa de *P. ovale* (África e Ásia) ou de *P. knowlesi* (responsável por casos de zoonoses no Sudeste Asiático). O *P. falciparum* está associado às maiores taxas de mortalidade e virulência, especialmente na África Subsaariana, no entanto *P. vivax* é a espécie mais difundida geograficamente, particularmente no Sul e Sudeste Asiático, América Central e América do Sul, sendo responsável por mais de 40% de casos de malária em todo o mundo. O *P. malariae* teve uma prevalência maior no passado, embora possa ser subnotificada na Amazônia brasileira e colombiana.^(2,3)

A gravidade e a evolução clínica na malária dependem da espécie do plasmódio infectante, intensidade da parasitemia, da idade, constituição genética, estado nutricional e sua imunidade específica à malária. A malária por *P. falciparum* é a que evolui com mais frequência para as formas

graves, pois esta espécie pode determinar parasitemia elevada (> 2% de hemácias infectadas), pela capacidade de multiplicar-se em hemácias jovens, maduras e senescentes, por citoaderir ao endotélio vascular da microcirculação e formar rosetas (eritrócitos infectados aderem a eritrócitos não infectados) em áreas nobres, cérebro, pulmões e rins.^(4,5) Estes eventos podem levar à malária cerebral, distúrbios respiratórios, anemia, hipoglicemia e raramente na criança à insuficiência renal, edema pulmonar e distúrbios da coagulação. Receptores expressos na superfície do endotélio vascular têm sua expressão aumentada por uma importante citocina pró-inflamatória, a TNF- α , determinando o sequestro de eritrócitos parasitados e formação de rosetas na microcirculação de órgãos vitais, culminando com a obstrução desses pequenos vasos, por exemplo, no cérebro –malária cerebral, evento muito frequente em crianças. Na malária cerebral, observa-se também concentrações aumentadas de angiopoietina 2 que alteram a permeabilidade da barreira hematoencefálica, levando ao extravasamento de proteínas plasmáticas, edema perivascular e injúria neuronal. Os eventos fisiopatológicos que culminam com a malária cerebral não estão associados somente com a obstrução do fluxo vascular na microcirculação, com a ausência de sequestro microvascular em todos os casos fatais e com a rápida resolução do coma e posterior recuperação na maioria dos pacientes, o que faz supor que liberação de citocinas induza a uma encefalopatia metabólica.

A ruptura cíclica de hemácias infectadas com liberação de parasitos, pigmento malárico (hemozoína) e glicosil-fostatidilinositol (toxina malárica) são responsáveis pelas manifestações clínicas na malária, pois ativam células mononucleares em sangue periférico que estimulam a liberação de citocinas inflamatórias. Na determinação da gravidade da malária ocorre um desequilíbrio na produção e/ou expressão de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias. Desse modo, o TGF- β e a IL-10, que contrarregulam a resposta pró-inflamatória, estão em baixas concentrações, como por exemplo na anemia grave dessa doença. Entretanto, outros fatores podem concorrer para essa fisiopatogenia,

¹ Professor Titular e Livre-Docente em Parasitologia Humana. Centro de Investigação de Microrganismos. Departamento de Microbiologia e Parasitologia - Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, RJ, Brasil.

Recebido em 10/03/2021

Aprovado em 29/04/2021

DOI: 10.21877/2448-3877.202100969

como diseritropoiese induzida por citocinas e participação de mecanismos autoimunes. Assim, a anemia da malária, usualmente normocítica e normocrômica, incide na sua forma grave (Hemoglobina < 5g/dL) em dois grupos de maior risco: gestantes e crianças menores de cinco anos. Entretanto, pode ser microcítica e hipocrômica, pela elevada frequência de hemoglobinopatias e deficiência de ferro nas mesmas áreas em que a malária é endêmica.⁽⁵⁾

A fisiopatologia da anemia da malária, ainda não completamente elucidada, é complexa, multifatorial e envolve, além da desregulação da resposta imune, os seguintes mecanismos: a) destruição de eritrócitos parasitados e não parasitados (porém, com produtos do parasito aderidos à superfície) na circulação periférica, com importante participação do baço, sem relação direta com a intensidade da parasitemia; b) redução ou alteração na produção de precursores eritroides (diseritropoiese), mediada por citocinas, cuja importância na gênese da anemia parece ser maior na doença de longa duração e menor nos casos agudos. Apesar da intensidade da anemia, no sangue periférico, pode haver baixa contagem de reticulócitos, o que indiretamente expressa algum grau de disfunção da medula óssea, observado por um curto período de tempo, mesmo após erradicação do parasito pelo uso de antimaláricos e lâminas com gota espessa sucessivamente negativas. Com frequência, crianças com malária pelo *P. falciparum* apresentam hipoglicemia, por gliconeogênese hepática insuficiente, que possui relação direta com níveis elevados de parasitemia. Eventos fisiopatológicos responsáveis por malária grave e até óbito também ocorrem na malária por *P. vivax*. Semelhante à importância da citoadesão nas formas graves de malária pelo *P. falciparum*, este fenômeno pode também estar presente nas infecções pelo *P. vivax*.⁽⁴⁾

As manifestações clínicas na malária são de caráter sistêmico em que a febre constitui o principal sinal ou sintoma, presente em quase todos os pacientes. A febre costuma ser elevada, precedida de calafrio e seguida de sudorese e sem periodicidade (exceto se houver sincronismo na ruptura de eritrócitos parasitados, trazendo como consequência febre a cada 48/48 horas nas infecções por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale*, ou a cada 72/72 horas nas infecções por *P. malariae*). Quando a febre é acompanhada de cefaleia e calafrio, denomina-se de tríade malárica. Anorexia e artralgia podem também ocorrer, ao lado de manifestações respiratórias (tosse e sensação de falta de ar) e gastrointestinais (dor abdominal, náusea, vômitos e diarreia).⁽⁵⁾

Os perfis de transmissão da doença no Brasil são diferentes e observados em três ambientes distintos; na Amazônia e na Mata Atlântica, ambas com predomínio de casos indígenas, e em outras regiões, com casos importados de viagens recentes a áreas endêmicas de malária no país, ou em outras da América Central e do Sul, países africanos ou asiáticos. Sua transmissão em áreas brasileiras

é caracterizada como hipoendêmica a mesoendêmica, com transmissão instável com flutuações sazonais anuais. Além disso, nos últimos anos, complicações clínicas associadas a casos fatais de infecção por *P. vivax* têm sido relatadas no Brasil, sendo motivo de preocupação para pesquisadores brasileiros que trabalham com malária. A malária em viagens tem sido motivo de preocupação, pois toda a região extra-amazônica é receptiva à transmissão da doença por migrantes infectados de outras áreas endêmicas e os serviços de vigilância sanitária em alguns municípios carecem de estrutura adequada para enfrentar o problema.⁽⁶⁾

A Organização Mundial de Saúde considera o diagnóstico rápido e preciso como o primeiro elemento básico da estratégia de controle da malária, contribuindo para a redução de sua morbidade/mortalidade. Parâmetros como alta sensibilidade e especificidade, custo reduzido, execução oportuna e acurácia dos exames laboratoriais são essenciais para estabelecer satisfatoriamente a realização de exames laboratoriais para o diagnóstico do agente responsável pela malária. Em abril de 2017, o Programa Nacional de Controle da Malária do Ministério da Saúde estabeleceu estratégias para diminuir a morbidade/mortalidade da doença, reduzir a gravidade dos casos e interromper a transmissão quando possível e manter a doença eliminada onde esse objetivo foi alcançado. Além disso, essas estratégias visam o diagnóstico de qualidade, por meio do tratamento, controle eficaz do vetor, educação para a promoção da saúde, prevenção e contenção dos surtos como atividades fundamentais para interromper a transmissão e controlar a doença.^(1,7) Deve-se considerar que o diagnóstico laboratorial da malária é necessário, tendo em vista que as características clínicas da malária são inespecíficas e se sobrepõem às características de outras doenças febris, bem como à hepatoesplenomegalia, icterícia e colúria; principalmente com arboviroses, leptospirose, febre tifoide, septicemias e recentemente a COVID-19. Além disso, esses procedimentos específicos são essenciais, uma vez que o tratamento com antimaláricos é baseado em estágio específico da espécie.⁽⁸⁾

No Brasil, a gota espessa (GE) corada por Giemsa, segundo o método de Walker, é o método de escolha (padrão ouro) para o diagnóstico da malária, a fim de identificar a espécie do parasito causador da infecção. A GE é realizada por punção digital sem a necessidade do paciente estar febril no momento da coleta. Possui sensibilidade maior que 80% e especificidade de 100%; é satisfatório no diagnóstico e permite a quantificação da forma parasitária, essencial para o acompanhamento da terapia aplicada, e relativamente barato. O limite de detecção é de 5 a 10 parasitos por microlitro de sangue.⁽¹⁾ Considere, no entanto, que a GE negativa nem sempre exclui a malária, pois alguns antibióticos têm certa ação antiplasmódica, reduzindo a parasitemia e dificultando a localização do protozoário. Nesse caso, se houver forte suspeita diagnóstica, o teste

deve ser repetido. Podemos destacar como desvantagem da GE a limitação do diagnóstico na baixa parasitemia e na detecção da infecção mista; além disso, o atraso no processamento pode resultar em alterações na morfologia e prejudicar a detecção segura. Embora a GE seja barata, torna-se um desafio treinar microscopistas, capacitando-os a desempenhar e manter o nível de competência.⁽³⁾

Assim como o esfregaço sanguíneo, também permite que tanto o parasito seja visualizado, quanto a espécie de plasmódio seja detectada mais facilmente, mas tem a desvantagem de a lâmina conter apenas uma camada de sangue em oposição à gota espessa que possui várias camadas, que facilita a localização do parasito e também a identificação da espécie pela experiência do microscopista.⁽⁷⁾

Assim, foram criados métodos alternativos de diagnóstico, como os testes imunocromatográficos (também conhecidos como teste de diagnóstico rápido - TDR) usados, especialmente, se o diagnóstico microscópico não estiver disponível ou não for confiável. Esses testes disponíveis comercialmente são baseados em quatro proteínas plasmódicas diferentes: Histidina (HRP2 – específico para *P. falciparum*), Lactato desidrogenase (LDH), Pan-LDH e aldolase. Os TDRs não requerem equipamentos e eletricidade, e requerem apenas um treinamento mínimo e, portanto, são indicados em áreas remotas onde não há laboratórios para realização de GE. Nos últimos anos, com o advento das tecnologias moleculares, novos métodos diagnósticos baseados na reação em cadeia da polimerase tradicional (PCR) ou quantitativa em tempo real (qPCR) foram introduzidos, utilizando a subunidade menor do RNA ribossômico e o DNA mitocondrial como alvos. Essas técnicas são reconhecidas como os métodos mais sensíveis e específicos de diagnóstico, detectando parasitemia submicroscópica e com redução do volume sanguíneo. Além disso, a PCR deve ser a técnica escolhida fora da área endêmica, pois nessas regiões as apresentações clínicas do paciente sintomático induzem o médico a um diagnóstico de dengue.

^(1,2)As técnicas moleculares ainda apresentam limitações de uso prático, principalmente pelo alto custo envolvido. Nas diferentes etapas do processamento, incluem equipamentos e reagentes caros, além de depender de uma estrutura organizacional para coleta, transporte e processamento das amostras, o que resulta em um longo tempo para a obtenção dos resultados. Um método alternativo ao PCR, ainda em avaliação para o diagnóstico da malária, é o *RealLamp*, que se baseia na amplificação isotérmica de ácidos nucleicos. Sua vantagem está na facilidade de uso em campo, pois não requer uma infraestrutura laboratorial sofisticada e utiliza um simples aparelho portátil capaz de realizar a amplificação e a detecção do produto em uma única plataforma.

Em dezembro de 2019, um novo Coronavírus foi identificado ser responsável por muitos casos de pneumonia em Wuhan, uma cidade na província de Hubei, na China. O

número de casos aumentou, excessivamente, na China e, em seguida, em todo o mundo causando uma pandemia. O vírus é agora denominado coronavírus de síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2).⁽⁸⁾ A doença foi inicialmente relatada à OMS em 31 de dezembro de 2019, e a epidemia de COVID-19 foi declarada uma emergência de saúde global em janeiro de 2020, então uma pandemia global em 11 de março de 2020. Embora a malária e a COVID-19 possam ter uma apresentação semelhante, os sintomas comuns que compartilham incluem, mas não são limitados a: febre, dificuldade em respirar, cansaço e cefaleia de início agudo, que pode levar a um diagnóstico incorreto de malária para COVID-19 e vice-versa, especialmente quando o clínico confia principalmente nos sintomas.⁽⁴⁾ Sintomas comuns de infecção com SARS-CoV-2 incluem febre, tosse, falta de ar, calafrios, mialgia, dor de cabeça, dor de garganta e nova perda do paladar ou cheiro; o início dos sintomas geralmente ocorre 4 a 5 dias após a infecção, embora possa ser até 14 dias, e nem todas as pessoas infectadas desenvolvem sintomas. Aproximadamente uma semana após o desenvolvimento dos sintomas, alguns dos pacientes experimentam uma piora aguda, com um pronunciado aumento sistêmico de mediadores inflamatórios e citocinas. A resposta inflamatória sistêmica severa, referida como uma “Tempestade de citocinas”, é caracterizada por um aumento acentuado dos níveis de interleucinas e TNF- α , e está associada ao desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Hipertensão, diabetes, doença cardiovascular, doença respiratória preexistente e obesidade foram comorbidades comuns; em uma meta-análise de 1.576 pacientes na China, todas, exceto diabetes e obesidade, foram associadas ao aumento do risco de doença grave.^(8,9)

Das cinco espécies de parasitos que causam malária em humanos, o *P. falciparum* é responsável pela maior parte da morbidade e mortalidade, seguida por *P. vivax*. Os eritrócitos infectados se lisam e liberam merozoítos na circulação, causando ativação do sistema imunológico e levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , INF-g, IL-6 e IL-12.⁽⁵⁾ Esta cascata de citocinas leva a sintomas de malária, e tal como acontece com a COVID-19, a resposta imune celular na malária deve ser cuidadosamente regulada para alcançar uma resposta protetora sem causar impacto adverso no hospedeiro. As manifestações graves da malária são frequentemente devidas a respostas pró-inflamatórias excessivas. O mesmo parece ser verdadeiro em pelo menos alguns casos de COVID-19, sugerindo que uma coinfeção que também leva a respostas pró-inflamatórias excessivas pode resultar em manifestações mais graves e prognóstico desfavorável.⁽⁴⁾

A imunossupressão induzida por malária também foi observada em muitas coinfeções, inibindo significativamente respostas a outra infecção. No entanto, a imunomodulação induzida pela malária tem sido apresentada como protetora

contra as manifestações graves de alguns vírus respiratórios. No Quênia, crianças hospitalizadas diagnosticadas com *influenza* e malária eram menos propensas a sofrer problemas respiratórios do que aqueles com *influenza* isoladamente.^(1,5) No entanto, em um modelo murino, o controle viral também foi prejudicado, levando a aumento da disseminação viral. Dinâmicas semelhantes podem ocorrer durante a coinfeção *Plasmodium* e SARS-CoV-2; induzida por malária, a imunossupressão pode levar a manifestações mais leves de COVID-19, mas simultaneamente diminui o controle viral, potencialmente aumentando ou sustentando as cargas virais, o que poderia aumentar o potencial para transmissão viral.

Desconforto respiratório, observado em até 25% dos adultos e 40% das crianças com malária *P. falciparum* grave, tem várias causas, incluindo anemia grave, acidose metabólica, citoaderência de eritrócitos infectados nos vasos pulmonares e coinfeções com patógenos causadores de pneumonia.⁽¹⁾ O espectro clínico varia de sintomas respiratórios superiores leves a lesão pulmonar aguda e síndrome respiratória aguda (SARS) fatal. A síndrome do desconforto respiratório agudo é rara em crianças pequenas com malária, mas ocorre em 5% a 25% dos adultos e 29% das mulheres grávidas com infecções graves por *P. falciparum*, e menos comumente com malária *P. vivax*. Na malária e COVID-19, a SARS está ligada a citocinas inflamatórias mediadas pelo aumento da permeabilidade capilar ou dano endotelial, que resulta em grande dano alveolar. Dada esta situação, as coinfeções por *Plasmodium* spp. e SARS-CoV-2 podem resultar em deterioração particularmente rápida, com um mau prognóstico. No dano alveolar mediado por inflamação e induzido por malária, a SARS progride mesmo após o tratamento e a eliminação do parasito. Indivíduos coinfectados podem ser propensos a COVID-19 grave, porque tanto a malária quanto a COVID-19 podem levar a manifestações clínicas semelhantes, incluindo febre e sintomas respiratórios, um ou o outro pode ser esquecido em um diagnóstico diferencial de dificuldade respiratória, levando a um aumento do número de mortes. À medida que a transmissão do SARS-CoV-2 aumenta, particularmente na África e na Índia, os médicos devem ter isso em mente. Além disso, documentar a frequência, a distribuição e os resultados destas coinfeções é de suma importância.⁽⁸⁻¹⁰⁾

Considerando que as sequelas hematológicas de COVID-19 ainda estão sendo elucidadas, uma meta-análise que descreve 1.210 pacientes COVID-19 de quatro estudos descobriu que os valores de hemoglobina eram 0,71 g/dL (95% CI: 0,59-0,83 g/dL) menor em indivíduos com doença grave *versus* doença mais branda.⁽⁵⁾ Se hemoglobina mais baixa é um fator de risco ou uma sequela da COVID-19 grave é desconhecido. No entanto, devido às reservas limitadas, mesmo pequenas perturbações na capacidade de transporte de oxigênio em indivíduos com a anemia malárica podem

resultar em oxigenação tecidual insuficiente em meio a insuficiência respiratória induzida por COVID-19.⁽⁴⁾

Embora o SARS-CoV-2 tenha se espalhado globalmente, nossa compreensão da epidemiologia e do curso clínico da COVID-19 em países com cargas substanciais de malária e doenças tropicais negligenciadas (DTNs) está apenas começando. Provavelmente, porque a transmissão começou mais tarde nesses países endêmicos de malária e porque os testes para SARS-CoV-2 são limitados na maioria dos países de baixa ou média renda (PBMRs). Se uma mudança para uma resposta Th2 é mais comum, e se essa mudança fornece alguma proteção contra doenças graves, enquanto reduz a imunidade a longo prazo ou aumenta o período de eliminação viral, a epidemiologia de COVID-19 em PBMRs pode ser substancialmente diferente do que foi visto em outros lugares.^(2,4) Plataformas de vigilância em desenvolvimento rápido para monitorar sinais de coinfeção SARS-CoV-2 com malária ou outras doenças tropicais negligenciadas será de extrema necessidade. Esforços para caracterizar casos de COVID-19 em PBMRs, como a adição do teste de SARS-CoV-2 e a vigilância epidemiológica, poderiam ser expandidos, com base na localidade, prevalência de malária e DTNs, para incluir testes de malária. Esses testes adicionais podem ajudar a determinar as taxas de coinfeção e comparar a gravidade dos resultados por *status* de infecção. Esforços adicionais para descrever mais cuidadosamente os impactos da clínica de coinfeções devem continuar a ser investigados e, assim, entender o impacto potencial do COVID-19 nos PBMRs e mitigar os piores resultados.^(8,10)

Estudos revelaram que o SARS-CoV-2 usa o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) para entrar nas células hospedeiras. O ANG II é o substrato para ACE2 e quando acumulado pode então aumentar a agregação de neutrófilos e intensificar permeabilidade vascular, ocorrendo uma exacerbação do edema pulmonar. Por outro lado, estudos demonstram que algumas mutações nesse gene podem oferecer proteção na malária e também na COVID-19.^(4,10)

A cloroquina (CQ) e a hidroxicloroquina (HCQ) são 4-aminoquinolinas com rápida atividade esquizotóxica. Não tem ação contra as formas hepáticas do parasito (hipnozoítos) de malária pelo *P. vivax* e *P. ovale*. Além de seu efeito antimalárico, a cloroquina tem também ação anti-inflamatória.⁽⁷⁾ A principal teoria do mecanismo antimalárico está relacionada ao bloqueio do processo de desintoxicação dos parasitos, e se concentra nos vacúolos alimentares dos plasmódios sensíveis, onde aumenta o pH. Desta forma, inibem a atividade peroxidativa do heme e interrompem sua polimerização não enzimática em hemozoína. A incapacidade de ativar o heme destrói os parasitos por meio de lesões oxidativas e das membranas proteases digestivas.⁽³⁾ Os efeitos colaterais comuns entre CQ/HCQ incluem distúrbios gastrointestinais (vômito, náusea, diarreia,

dor no estômago, anorexia e perda de peso) e reações na pele (*rash* cutâneo, prurido e perda de cabelo). São observados raros casos de falha renal e reações alérgicas. CQ/HCQ podem também causar reações adversas fatais ou sérias no coração e retina, epilepsia, hipoglicemia, bem como envenenamento causado por overdose. Retinopatia irreversível ocorre em 1% dos casos por uso contínuo – 5 a 7 anos. Apesar de CQ e HCQ poderem bloquear a infecção por SARS-CoV-2 em células epiteliais renais Vero E3, este efeito parece ser específico do tipo celular. Estudos relataram que CQ e HCQ não inibiram a entrada de SARS-CoV-2 em células pulmonares *in vitro*, uma vez que CQ e HCQ não têm como alvo uma protease transmembrana, independente do pH, que é uma chave da molécula para infecção viral em células epiteliais das vias aéreas. Infelizmente, nem todos os estudos *in vitro* encorajadores para o SARS-COV-2 podem ser traduzidos em configurações *in vivo*.^(2, 9)

Finalmente, os programas de controle de malária estão sendo afetados de várias maneiras pela COVID-19. Para a prevenção da malária, os mosquiteiros tratados com inseticida precisam ser renovados regularmente, mas as campanhas de distribuição foram adiadas ou canceladas. Para a detecção e tratamento da malária, os indivíduos podem parar de frequentar as unidades de saúde por medo de exposição à COVID-19 ou porque não podem pagar pelo transporte, e os profissionais de saúde precisam de recursos adicionais para a proteção contra a COVID-19. Ainda, o fornecimento de insumos para diagnóstico e medicamentos está sendo interrompido em alguns países, o que é agravado pela produção de medicamentos e diagnósticos abaixo do padrão e falsificados.

REFERÊNCIAS

1. Menezes RAO, Gomes MDSM, Mendes AM, Couto ÁARA, Nacher M, Pimenta TS, Sousa ACP, Baptista ARS, Jesus MI, Enk MJ, Cunha MG, Machado RLD. Enteroparasite and vivax malaria co-infection on the Brazil-French Guiana border: Epidemiological, haematological and immunological aspects. *PLoS One*. 2018;13(1):e0189958. doi: 10.1371/journal.pone.0189958. PMID: 29293589.
2. Lei Zi-Ning, Wu Zhuo-Xun, Dong S, Yang Dong-Hua, Zhang L, ZunfuKe et, al.. Chloroquine and hydroxychloroquine in the treatment of malaria and repurposing in treating COVID-19. *PharmacolTher*. 2020; 216:107672 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107672.
3. Pratt-Riccio LR, Baptista BO, Torres VR, Bianco-Junior C, Perce-Da-Silva DS, Riccio EKP, Lima-Junior JDC, Totino PRR, Cassiano GC, Storti-Melo LM, Machado RLD, de Oliveira-Ferreira J, Banic DM, Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT. Chloroquine and mefloquine resistance profiles are not related to the circumsporozoite protein (CSP) VK210 subtypes in field isolates of *Plasmodium vivax* from Manaus, Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019;114:e190054. doi: 10.1590/0074-02760190054. Epub 2019 Aug 12.
4. Hussein MIH, Albashir AAD, Elawad OAMA, Homeida A. Malaria and COVID-19: unmasking their ties. *Malar J*. 2020;23;19(1):457. doi: 10.1186/s12936-020-03541-w.
5. Ventura AMRDS, Fernandes AAM, Zanini GM, Pratt-Riccio LR, Sequeira CG, do Monte CRS, Martins-Filho AJ, Machado RLD, Libonati RMF, de Souza JM, Daniel-Ribeiro CT. Clinical and immunological profiles of anaemia in children and adolescents with *Plasmodium vivax* malaria in the Pará state, Brazilian Amazon. *Acta Trop*. 2018;181:122-131. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.01.022. Epub 2018 Feb 2.
6. Monteiro TH, Chaves Tdo S, Matos HJ, Soffiatti NF, Guimarães RJ, Guimarães LH, Ventura AM, Machado RLD. Basic sanitation, socioeconomic conditions, and degree of risk for the presence and maintenance of malaria in a low-transmission area in the Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(5):573-9. doi: 10.1590/0037-8682-0118-2015.
7. Gomes Mdo S, Vieira JL, Machado RLD, Nacher M, Stefani A, Musset L, Legrand E, Menezes RA, Júnior AA, Sousa AP, Couto VS, Couto AA. Efficacy in the treatment of malaria by *Plasmodium vivax* in Oiapoque, Brazil, on the border with French Guiana: the importance of control over external factors. *Malar J*. 2015;14:402. doi: 10.1186/s12936-015-0925-7.
8. Amimo F, Lambert B, Magit A. What does the COVID-19 pandemic mean for HIV, tuberculosis, and malaria control? *Trop Med Health*. 2020; 48:32. doi: 10.1186/s41182-020-00219-6. eCollection 2020.
9. Chiodini J. COVID-19 and the impact on malaria. *Travel Med Infect Dis*. 2020; 35:101758. doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101758. Epub 2020 May 29.
10. Gutman JR, Lucchi NW, Cantey PT, Steinhart LC, Samuels AM, Kamb ML, Kapella BK, McElroy PD, Udhayakumar V, Lindblade KA. Malaria and Parasitic Neglected Tropical Diseases: Potential Syndemics with COVID-19? *Am J Trop Med Hyg*. 2020;103(2):572-577. doi: 10.4269/ajtmh.20-0516. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32484155.

Correspondência

Ricardo Luiz Dantas Machado

Instituto Biomédico - Bloco E salas 526/527/532

Outeiro São João Batista s/n - Campus Valonguinho

Niterói - Rio de Janeiro

CEP: 24020-141

Qual é o real impacto de resultados falsos negativos no diagnóstico da COVID-19?

What is the actual impact of false-negative results on COVID-19 diagnosis?

Carlos Hernani Cruz Marmol¹

Prezado Editor,

Quantas pessoas ao redor do mundo receberam resultados negativos para Covid-19 quando na verdade deveriam ser positivos? A resposta para esta questão pode ser imprecisa e os motivos que levaram aos resultados falsos negativos, podem ser vários¹. Porém, uma das hipóteses para este desfecho pode ter sido simplesmente um equívoco anatômico durante a coleta de secreção da nasofaringe¹. Para realizar o RT-PCR, exame considerado padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19², é preciso obter uma pequena amostra de secreção da nasofaringe, porém é possível que o swab – objeto específico para coletar amostras biológicas – possa não atingir o alvo correto, e isso pode levar ao resultado falso negativo¹. Detectar rapidamente os casos positivos possibilita isolar o indivíduo e reduzir a transmissão da doença, e quando isso não ocorre a disseminação permanece. Sendo assim, quantas pessoas não foram isoladas em decorrência de resultados falsos negativos? E qual foi a contribuição deste lapso nos números alarmantes de mortes causadas pela COVID-19?

Enquanto a pandemia mostrava seu “lado sombrio”, resultados falsos negativos podem ter ocorrido por uma combinação de dois fatores, alta demanda para coleta de amostras em casos suspeitos da doença e escassez de profissionais treinados para esta atividade^{1,3}. Dessa forma, muitos deles foram recrutados sem experiência³, pois o cenário obrigava ações emergenciais e, provavelmente, isso pode ter desencadeado uma sequência de erros durante a obtenção de amostras da nasofaringe.

A fase pré-analítica é responsável por todos os passos que antecedem a análise laboratorial do espécime, incluindo sua coleta; qualquer erro nesta etapa pode comprometer a veracidade dos resultados laboratoriais, podendo até mesmo gerar resultados falsos negativos. Em 1983 – há quase 40 anos – o pesquisador Edward P. Fody já havia demonstrado

a grande importância da etapa de obtenção de amostras biológicas, descrevendo, inclusive, a atenção necessária para se obter amostras da nasofaringe⁴. Se digitarmos “fase pré-analítica” em qualquer site de busca, veremos o quão conhecido o tema é. Portanto, neste momento, faço outra pergunta: para onde estamos olhando?

Durante esta pandemia, a medicina 4.0 mostrou sua força em prol da saúde coletiva⁵, e o leque de alternativas tecnológicas provavelmente ainda irá se expandir. No entanto, orientações básicas para procedimentos diagnósticos permanecem sendo negligenciados. Devemos conter o entusiasmo nesta era de tecnologias emergentes e reconhecer que ainda dependemos de aspectos subjetivos na medicina laboratorial. Sobre tudo na fase pré-analítica, equilibrar velhos e novos conhecimentos parece ser um caminho prudente para preservar nossas vidas.

REFERÊNCIAS

1. Higgins TS, Wu AW, Ting JY. SARS-CoV-2 Nasopharyngeal Swab Testing—False-Negative Results From a Pervasive Anatomical Misconception. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, v. 146, n. 11, p. 993-994, 2020. ISSN 2168-6181.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Recommendations for national SARS-CoV-2 testing strategies and diagnostic capacities. 2021. Disponível em: < <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-lab-testing-2021.1-eng> >.
3. Mehta S et al. COVID-19: a heavy toll on health-care workers. *The Lancet Respiratory Medicine*, v. 9, n. 3, p. 226-228, 2021. ISSN 2213-2600.
4. Fody EP. Preanalytic Variables: A Management Problem. *Clinics in laboratory medicine*, v. 3, n. 3, p. 525-540, 1983. ISSN 0272-2712.
5. Ioppolo G, et al. Medicine 4.0: New Technologies as Tools for a Society 5.0. *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 7, 2020.

Correspondência

Carlos Hernani Cruz Marmol
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
São Carlos - São Paulo - Brasil
e-mail: hernanic48@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6930-1077>

¹ Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos - São Paulo - Brasil.



Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS
Brazilian Journal of Clinical Analyses

ISSN 2448-3877 – Versão Online
ISSN 0370-369-X – Versão Impressa

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 a 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 Trial 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 categorias 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 (excetuando-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".

SUORTE 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 Biomédica] pelo *International Committee of Medical Journal Editors [ICMJE]* (<http://www.icmje.org>) e que pode ser consultado em www.scielo.br/pdf/rcbc/v35n6/v35n6a14.pdf (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 Chamada 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 deverá 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 Diabetes,⁽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,⁽⁶⁾ 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. Paracoccidioidomycosis. Clin Dermatol. 2012 Nov;30(6):610-5.
- **Mais de um autor:** Lee MY, Telisingshe 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-Ingraff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. Cryptococcus neoformans-Crypto-

coccus 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:** Dettenkofer 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. Expediente 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, Niéro-Melo L, Bagagli E, Camargo CH, Brude-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/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/pgr/pdf/rdc30604anvisa.pdf>.

• **Eventos Científicos:** Albuquerque P, Kyaw CM, Saldanha RR, Brígido 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.

Nome dos autores e assinaturas:

1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____

Data: ____/____/____.