

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

LÍLIAN SANTOS DA SILVA ALVES

**ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DE COINFEÇÃO PELO HERPESVÍRUS EM
PACIENTES COM COVID-19 INTERNADOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO ANTÔNIO PEDRO, NITERÓI - RJ**

Niterói, RJ

2021

LÍLIAN SANTOS DA SILVA ALVES

**ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DE COINFEÇÃO PELO HERPESVÍRUS EM
PACIENTES COM COVID-19 INTERNADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
ANTÔNIO PEDRO, NITERÓI - RJ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia da Universidade
Federal Fluminense, como requisito parcial
Para obtenção do Grau de Mestre.
Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Profa. Dr^a. Andrea Alice da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Reis Almeida

Dr^a. Cintia Fernandes de Souza

Niterói, RJ

2021

A474a Alves, Lílian Santos da Silva
Análise de frequência de coinfeção pelo Herpesvírus em
pacientes com Covid-19 internados no hospital
universitário Antônio Pedro, Niterói - RJ / Lílian Santos da Silva Alves ; Andrea Alice
da Silva, orientadora ; Jorge Reis Almeida, coorientador ; Cintia Fernandes de Souza,
coorientadora. Niterói, 2021.
82 f.

Dissertação (Mestrado em Patologia)- Universidade Federal Fluminense, Niterói,
2021.

1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. Coinfeção. 4. Herpesvirus Humano 4. 5.
Herpesvirus Humano 6. 6. Teste de Ácido Nucleico para COVID-19. I. Silva, Andrea
Alice da, orientadora. II. Almeida, Jorge Reis, coorientador. III. Souza, Cintia
Fernandes de, coorientadora. IV. Universidade Federal Fluminense. Faculdade de
Medicina. V. Título

CDD 616.91

Bibliotecária responsável: Fernanda Daniel da Silva - CRB7/6180

LÍLIAN SANTOS DA SILVA ALVES

**ANÁLISE DE FREQUÊNCIA DE COINFECÇÃO PELO HERPESVÍRUS EM
PACIENTES COM COVID-19 INTERNADOS NO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO ANTÔNIO PEDRO, NITERÓI - RJ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia da Universidade
Federal Fluminense, como requisito parcial
Para obtenção do Grau de Mestre.
Área de concentração: Patologia Geral

Aprovado em 04 de junho de 2021

Banca examinadora

Prof^ª. Dra. Analúcia Rampazzo Xavier
(Avaliador prévio)
Universidade Federal Fluminense

Prof^ª. Dra. Flávia Barreto dos Santos
Fundação Oswaldo Cruz

Prof^ª. Dra. Izabel de Palmer Paixão
Universidade Federal Fluminense

Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele nada seria possível;

A minha família por todo apoio e
as pessoas que venham salvar a vida
com a contribuição deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da minha vida, pelas providencias nestes tempos difíceis permitindo que nada nos tenha faltado e todo crescimento/amadurecimento nesta trajetória.

Aos meus pais e irmãos agradeço por me incentivar ao desenvolvimento profissional e pelo apoio de sempre me tornar uma pessoa melhor, aprendendo a lidar com as crises de ansiedade e medos, sem nunca deixar de lutar pelos meus sonhos.

Aos meus sogros e meu namorado por toda ajuda e motivação durante essa jornada que próximo a ser concluída.

Agradeço as agências de fomento pelo financiamento do estudo, e ao Programa de Pós-Graduação pelo papel exercido na minha formação.

Agradeço aos meus orientadores professores Andrea Alice e Jorge Reis e Cintia por todo carinho, atenção, paciência e ensinamentos durante o desenvolvimento do estudo.

Sou muito grata por todos que compõe a equipe do Lamap, trabalhando juntos em dia bons e outros não tão bons e ao final sempre lutando para salvar vidas, que uma das principais vertentes desse laboratório. Gratidão por toda colaboração e torcida da Prof.^a Vanessa de Paula e da aluna Jessica Raposo ambas da Fiocruz por fazer parte dessa caminhada.

“Embora não possamos acrescentar dias a sua vida, podemos acrescentar vida aos seus dias.” - Cora Coralina

Resumo

INTRODUÇÃO: O novo Coronavírus (SARS-CoV-2) causa uma doença respiratória aguda, que no último ano se disseminou internacionalmente. A maioria dos casos se apresenta com sintomas respiratórios leves, porém uma pequena parte desenvolve a forma grave da doença. Coinfecções associadas com a infecção por Covid-19 podem exacerbar a gravidade do quadro clínico, levando ao aumento da mortalidade dos pacientes. Os Herpesvírus são vírus prevalentes na população mundial, de relevância clínico-laboratorial. Estes vírus causam infecções oportunistas, devido à reativação viral principalmente em indivíduos imunossuprimidos. **OBJETIVO:** Avaliar a presença de coinfecção por Herpesvírus em pacientes internados e positivos para a infecção pelo SARS-CoV-2. **MATERIAL E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo transversal observacional, que foi realizado com pacientes internados em estado moderado à crítico suspeito de COVID-19. Os pacientes incluídos neste estudo são de ambos os sexos, acima de 18 anos. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Federal Fluminense número CAAE n°. 30623520.5.0000.5243. Amostras de sangue e *swabs* de orofaringe e/ou nasofaringe foram coletadas na ocasião da internação. Para detecção do Coronavírus será utilizada a técnica de RT-qPCR, enquanto que para o diagnóstico diferencial dos Herpesvírus utilizamos a qPCR. Os dados clínicos e laboratoriais dos participantes do estudo foram obtidos por meio da análise dos prontuários médicos. Os dados laboratoriais foram analisados em tempo zero (T0) definida como na admissão do paciente e dia do RT-qPCR, tempo 1 (T1) definido como 7 dias após a admissão e tempo 2 (T2) após 14 dias da admissão. Os resultados encontrados foram avaliados utilizando o teste do qui-quadrado (χ^2), o teste *t de Student*, teste de *Mann Whitney* e ANOVA para análise pareada longitudinal. O nível de significância estatística foi considerado quando o valor de p for menor que 0,05, e foi utilizado o intervalo de confiança a 95%. **RESULTADOS:** A média de idade da população foi de 60,1 \pm 18,65 anos, com frequência maior do sexo masculino. As principais comorbidades foram: doenças cardiovasculares (41; 68,3%), câncer (38, 48,7%), diabetes (22; 33,3%) e doença renal crônica (11; 18,3%). A prevalência de coinfecção por Herpesvírus foi de 27/60 (45%), sendo destes 15 (25%) foram Epstein Barr (EBV), 13 (21,6%) foram Herpesvírus (HHV-6), cinco (8%) Citomegalovírus (HCMV), dois (3,3%) Vírus Varicela Zoster (VZV) e um (1,6%) Herpesvírus Simples tipo 1 (HSV-1). Além do SARS-CoV-2, também identificamos nove pacientes com coinfecção: dois com Herpesvírus, cinco com EBV/HHV-6, dois com EBV/VZV e um com EBV/CMV e EBV/VZV cada. Dos 60 pacientes 28 (46,7%) foram a óbito, destes seis (21,45%) tiveram SARS-CoV-2/EBV, quatro (14,2%) SARS-CoV-2 /HHV-6, dois (7,2%) SARS-CoV-2/CMV e uma infecção por SARS-CoV-2 /EBV/HHV-6(3,5%) e outra por (3,5%) SARS-CoV-2/ EBV/CMV. **CONCLUSÃO:** A coinfecção por Herpesvírus mostrou-se presente em 45% dos casos SARS-CoV-2 positivo em estado clínico moderado a crítico, sendo a coinfecção mais prevalente pelo EBV e HHV-6, principalmente nos casos de imunossupressão, podendo contribuir com agravamento do quadro clínico. Nos pacientes coinfectados por Herpesvírus pode ser observado número maior de óbitos em pacientes com idade superior a 60 anos. Alterações de ferritina, ureia, hemoglobina e linfopenia podem ser indicativos de agravamento nos pacientes com coinfecção por Herpesvírus.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, Covid-19, Coinfecção viral, Herpesvírus, RT-qPCR.

Abstract

INTRODUCTION: The new Coronavirus (SARS-CoV-2) causes acute respiratory disease, which has spread internationally in the last year. Most cases present with mild respiratory symptoms, but a small part develops the severe form of the disease. Coinfections associated with Covid-19 infection can exacerbate the severity of the clinical condition, leading to increased patient mortality. Herpesviruses are prevalent viruses in the world population, of clinical and laboratory relevance. These viruses cause opportunistic infections, due to viral reactivation mainly in immunosuppressed individuals. **OBJECTIVE:** To evaluate the presence of herpesvirus coinfection in inpatients and positive for SARS-CoV-2 infection. **MATERIAL AND METHODS:** This is an observational cross-sectional study, which was conducted with patients hospitalized in a moderate state to the suspected critical of COVID-19. The patients included in this study are of both sexes, above 18 years old. The study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal Fluminense number CAAE n°. 30623520.5.0000.5243. Blood samples and oropharyngeal and / or nasopharyngeal swabs were collected at the time of admission. For the detection of Coronavirus, the RT-qPCR technique will be used, while for the differential diagnosis of Herpesviruses, we use qPCR. The clinical and laboratory data of the study participants were obtained through the analysis of medical records. Laboratory data were analyzed at zero time (T0) defined as at the patient's admission and day of RT-qPCR, time 1 (T1) defined as 7 days after admission and time 2 (T2) after 14 days of admission. The results found were evaluated using the chi-square test (X²), Student's t test, Mann Whitney test and ANOVA for longitudinal paired analysis. The level of statistical significance was considered when the p value was less than 0.05, and the 95% confidence interval was used. **RESULTS:** The average age of the population was 60.1 ± 18.65 years, with a higher frequency of males. The main comorbidities were cardiovascular diseases (41; 68.3%), cancer (38, 48.7%), diabetes (22; 33.3%) and chronic kidney disease (11; 18.3%). The prevalence of Herpesvirus coinfection was 27/60 (45%), of which 15 (25%) were Epstein Barr (EBV), 13 (21.6%) were Herpesvirus (HHV-6), five (8%) Cytomegalovirus (HCMV), two (3.3%) Varicella Zoster Virus (VZV) and one (1.6%) Simplex Herpesvirus type 1 (HSV-1). In addition to SARS-CoV-2, we also identified nine patients with co-infection: two with Herpesvirus, five with EBV/ HHV-6, two with EBV/ VZV and one with EBV/ CMV and EBV/ VZV each. Of the 60 patients 28 (46.7%) died, of these six (21.45%) had SARS-CoV-2/ EBV, four (14.2%) SARS-CoV-2/ HHV-6, two (7.2%) SARS-CoV-2 / CMV and one SARS-CoV-2/ EBV/HHV-6 infection (3.5%) and one by (3.5%) SARS-CoV-2/EBV/CMV. **CONCLUSION:** Herpesvirus coinfection was present in 45% of SARS-CoV-2 positive cases in moderate to critical clinical status, being the most prevalent coinfection by EBV and HHV-6, especially in cases of immunosuppression, which may contribute to worsening the condition. In patients co-infected with Herpesvirus, a greater number of deaths can be observed in patients aged over 60 years. Changes in ferritin, urea, hemoglobin and lymphopenia may be indicative of worsening in patients with Herpesvirus co-infection.

Keywords: SARS-CoV-2, Covid-19, Viral coinfection, Herpesvirus, RT-qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC: do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*

COVID-19: do inglês *Coronavirus disease 2019*

DENV: Vírus da dengue

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECA2: enzima conversora de angiotensina 2

EBV: Vírus Epstein- Bar

ELISA: do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*

HBV: Vírus da hepatite B

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HHV: Herpesvírus

HSV-1 /HHV-1: Herpesvírus simples tipo 1

HHV-6: Herpesvírus-6

CMV: Citomegalovírus humano

ICTV: do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*

LAMAP: Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas

MERS-CoV: do inglês *Middle East respiratory syndrome by coronavirus*

MHC: moléculas de histocompatibilidade

OMS: Organização Mundial da Saúde

qPCR: Reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa

Ptn C reativa: Proteína C reativa

PT: Tempo de protrombina

PTT: Tempo de tromboplastina ativada

RNA: ácido ribonucleico

RIFI: Reação de Imunofluorescência indireta

SARS-CoV: do inglês *severe acute respiratory syndrome by coronavirus*

SARS-CoV-2: do inglês *severe acute respiratory syndrome by coronavirus 2*

SHLH: Linfocitose hemofagocítica secundária

SPC: Serviço de Patologia Clínica do HUAP

VZV/ HHV-3: Vírus Varicela-zoster

WB: do inglês *Western blotting*

LISTA DE QUADRO

Quadro 1- Alterações laboratoriais em pacientes COVID-19	24
Quadro 2- Vacinas em desenvolvimento e suas respectivas metodologias	26
Quadro 3- Ciclagem de amplificação do RT-qPCR SARS-CoV-2	37
Quadro 4 – Interpretação dos resultados	37
Quadro 5 - Sequências de primers, sondas utilizadas na qPCR para detecção e quantificação dos Herpesvírus	38
Quadro 6 - Sequência da curva padrão sintética utilizado no PCR para quantificação dos Herpesvírus	39
Quadro 7- Termociclagem referente à PCR em tempo real para detecção e quantificação dos Herpesvírus	39
Quadro 8- Sequência primers, sonda e curva padrão para detecção e quantificação do PCR de Varicela Zoster	40

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Classificação dos Coronavírus Humanos	18
Figura 2 - Incidência de casos por COVID-19 no Brasil no período de fevereiro a abril de 2021	20
Figura 3- Incidência de óbitos por COVID-19 no período de fevereiro a abril de 2021.....	20
Figura 4 - Comparação dos Cycle Thershold segundo o alvo viral SARS-CoV-2 entre os grupos	46
Figura 5 - Comparação do desfecho de acordo com a idade no grupo SARS-CoV-2/Herpesvírus.....	54

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Características clínica e demográficas de pacientes hospitalizados com COVID-19 (Hospital Universitário Antônio Pedro, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil)	43
Tabela 2 - Distribuição das coinfeções virais de acordo com o estado de imunossupressão .	44
Tabela 3- Distribuição das coinfeções virais de acordo com as complicações	45
Tabela 4 - Análise dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no momento da admissão de acordo com a coinfeção de Herpesvírus em pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro	48
Tabela 5- Análise dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no período de 7 dias após admissão de acordo com a coinfeção de Herpesvírus em pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro	49
Tabela 6 - Análise dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no período de 14 dias após admissão de acordo com a coinfeção de Herpesvírus em pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro	50
Tabela 7 - Análise longitudinal dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no grupo com coinfeção de Herpesvírus nos pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro.....	52
Tabela 8 - Análise longitudinal dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no grupo com ausência de coinfeção de Herpesvírus nos pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro	53
Tabela 9 - Coinfeções por Herpesvírus de acordo com o desfecho de pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	O NOVO CORONAVÍRUS E SUA ESTRUTURA VIRAL.....	17
2.2	CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL	18
2.3	EPIDEMIOLOGIA DO SARS-COV-2.....	19
2.4	FORMAS DE TRANSMISSÃO E SINTOMAS	21
2.5	DIAGNÓSTICO E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS	22
2.6	TRATAMENTO DO PACIENTES SARS-COV-2 INTERNADOS.....	24
2.7	VACINAS PARA COVID-19.....	25
2.8	COINFECÇÕES NOS PACIENTES COVID-19	26
2.9	VÍRUS DA FAMÍLIA <i>HERPESVIRIDAE</i>	26
2.9.1	Herpes simples tipo 1	27
2.9.2	Vírus Varicela Zoster	28
2.9.3	Vírus Epstein-Barr	29
2.9.4	Citomegalovírus Humano	30
2.9.5	Herpesvírus 6	31
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	OBJETIVO GERAL.....	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5	MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1	DESENHO DO ESTUDO	35
5.2	LOCAL DO ESTUDO	35
5.3	CRITÉRIO DE INCLUSÃO	35
5.4	CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	35
5.5	COLETA DAS AMOSTRAS.....	35
5.6	ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS	36
5.7	AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA	36

5.8	INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO VIRAL.....	36
5.8.1	Extração e quantificação de RNA	36
5.8.2	Real-time PCR (RT-qPCR) para detecção do SARS-CoV-2	36
5.8.3	qPCR para HSV1, Epstein-Bar e Herpesvírus-6	38
5.8.4	Extração de DNA	39
5.8.5	qPCR para Citomegalovírus.....	40
5.8.6	qPCR para Varicela Zoster	40
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
6	RESULTADOS.....	42
6.2	Coinfecção de Herpesvírus em indivíduos SARS-CoV-2 positivos	42
6.3	Análises do <i>Cycle Thershold</i> dos pacientes SARS-CoV-2 de acordo com coinfecção ...	46
6.4	Análises do perfil bioquímico e hematológico dos pacientes SARS-CoV-2 hospitalizados... ..	46
6.4	Análise longitudinal dos dados bioquímicos e hematológicos dos grupos no estudo	51
6.6	Distribuição das coinfeções por Herpesvírus de acordo com desfecho clínico.....	54
7	DISCUSSÃO.....	56
8	CONCLUSÃO	63
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
	APÊNDICE 1 – FICHA DE COLETA DE DADOS DE PRONTUÁRIO	74
	ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	76
	ARTIGOs PUBLICADOs.....	78
	ARTIGOs PUBLICADOs.....	79
	Artigos em Fase de Submissão	80
	Artigos em Fase de Submissão	81
	Artigos em Fase de Elaboração e revisão	82

1 INTRODUÇÃO

Na província de Wuhan, na China, em dezembro de 2019, foi descrito o aumento de casos de pneumonia com causa desconhecida. (MALIK *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020a; WU; CHEN; CHAN, 2020) Amostras de lavado broncoalveolar foram coletadas dos pacientes que apresentavam histórico em comum, estas amostras foram testadas por meio de métodos de biologia molecular e identificaram um novo vírus no dia 7 de janeiro de 2020.(PEERI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020b) Este novo vírus pertence à família *Coronaviridae*, de patógenos responsáveis por causar doenças respiratórias, o novo Coronavírus (SARS-CoV-2, primeiramente denominado 2019-nCoV) foi caracterizado como o agente etiológico do *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) notada na China.(MALIK *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020b)

Os coronavírus são vírus envelopado com material genético composto por fita de RNA de polaridade positiva.(WU; CHEN; CHAN, 2020) Os coronavírus humanos frequentemente infectam pessoas em todo o mundo, acarretando uma infecção do trato respiratório superior, que se manifesta por sintomas comuns de resfriado. (BORDI *et al.*, 2020) Porém os coronavírus de origem zoonótica, como o SARS-CoV-2, podem evoluir para cepas mais agressivas e infectar seres humanos, levando a doenças fatais.(HABIBZADEH; STONEMAN, 2020) Os coronavírus são transmitidos de forma interpessoal, pela contaminação por partículas virais eliminadas através de tosse e/ou espirros, podendo contaminar também superfícies de uso comum.(WU; CHEN; CHAN, 2020)

O diagnóstico de um novo coronavírus acompanha diversos desafios, porém tem sido considerado padrão ouro para detecção de RNA viral métodos moleculares, como a reação de cadeia de polimerase (PCR).(WANG *et al.*, 2020b) O diagnóstico é realizado a partir de amostras de *swab* do trato respiratório, mas estudos já identificaram presença do RNA viral em amostras de fezes e sangue.(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020; WU; CHEN; CHAN, 2020) Os pacientes diagnosticados com COVID-19 apresentam alta carga viral, mesmo em indivíduos assintomáticos ou com sintomas leves, ao contrário do que observado na síndrome respiratória aguda grave por coronavírus (SARS-CoV) e na síndrome respiratória por coronavírus do Oriente Médio (MERS) (WANG *et al.*, 2020b), tornando as técnicas moleculares de diagnóstico de extrema relevância para o contexto atual. Atualmente, a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) é realizar diagnóstico laboratorial em todos os casos suspeitos. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020)

A infecção pelos Coronavírus causa um desequilíbrio no trato respiratório e no trato gastrointestinal, principalmente como já observado anteriormente nos casos de SARS e MERS. (PEERI *et al.*, 2020) Porém em relação ao Covid-19, em poucos casos foi observado sintomas relacionados com o trato gastrointestinal (como diarreia), o que temos relatos até o momento são os sintomas respiratórios como a pneumonia e uma “tempestade” de citocinas.(SAGHAZADEH; REZAEI, 2020) Com a tempestade de citocina pode haver um desequilíbrio do sistema imune, ou mesmo pela imunossupressão causada devido a infecção por SARS-CoV-2 poderia levar a reativação de Herpesvírus em latência.(KIM *et al.*, 2020; MCGONAGLE *et al.*, 2020)

A coinfeção pode ocorrer devido a resistência a drogas antibacterianas, inibição de resposta imune do hospedeiro, e mau prognóstico da doença.(ZHU *et al.*, 2020) O vírus Epstein Barr (EBV), outros Coronavírus e alguns vírus respiratórios entre os quais o vírus influenza A e o rinovírus / enterovírus podem ser os copatógenos mais comuns.(CHEN *et al.*, 2020; LAI; WANG; HSUEH, 2020b) Um estudo demonstrou que 94,2% das pessoas com COVID-19 podem apresentar coinfeções por outros microrganismos, como vírus, bactérias e fungos. (LAI; WANG; HSUEH, 2020a) Entre os copatógenos virais importantes destaca-se os vírus influenza A e B, rinovírus / enterovírus, vírus parainfluenza, metapneumovírus, vírus sincicial respiratório, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da dengue (DENV), vírus da hepatite B (HBV), citomegalovírus (CMV).(ZHU *et al.*, 2020)

Os pacientes internados em estado grave com COVID-19 positivo poderiam apresentar coinfeção por Herpesvírus, através de reativação viral, podendo aumentar a morbidade e/ou da mortalidade.(DRAGO *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020) A determinação da coinfeção por Herpesvírus com alta sensibilidade e especificidade através do diagnóstico molecular, poderá auxiliar no manejo clínico dos pacientes COVID-19 positivo. Assim nossa hipótese científica é de que os pacientes internados em quadro clínico moderado à crítico que tenham RT-qPCR COVID-19 positivo podem apresentar coinfeção por Herpesvírus, que ocasiona o aumento da morbidade e/ou da mortalidade. Este trabalho poderá contribuir na identificação de pacientes de risco, direcionando esses pacientes para aplicação de tratamento mais adequado e consequentemente diminuindo o tempo de hospitalização e a taxa de morbidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O NOVO CORONAVÍRUS E SUA ESTRUTURA VIRAL

Os coronavírus podem infectar uma grande variedade de hospedeiros. A infecção pelos coronavírus pode ser observada em camundongos, ratos, galinhas, perus, suínos, cães, gatos, coelhos, cavalos, gado e humanos, e podem causar uma variedade de doenças graves, incluindo gastroenterite e doenças do trato respiratório.(CUI; LI; SHI, 2019; GUY et al., 2000) No meado da década de 1960 foram identificados e estudados três coronavírus humanos HCoV-229E e HCoV-OC43 e podem acarretar o resfriado comum.(LAU et al., 2006; PYRC; BERKHOUT; VAN DER HOEK, 2007)

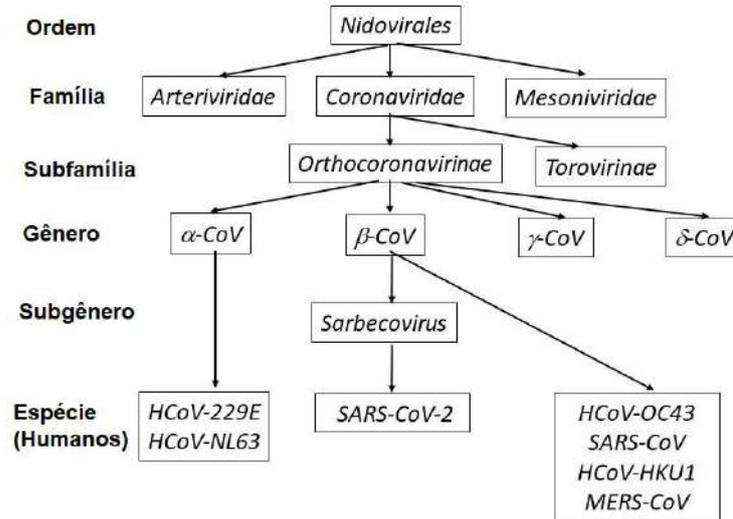
Nos anos de 2002 e 2003 houve a incidência do SARS - CoV (Síndrome Respiratória Aguda Grave - coronavírus) e em 2012 do MERS - CoV (Síndrome Respiratória do Oriente Médio - coronavírus) ambas epidemias mostraram o potencial para a transmissão de CoVs emergentes de animais para humano e de pessoa para pessoa.(DE GROOT et al., 2013; KSIAZEK et al., 2003; PETROSILLO et al., 2020) Ao todo existem sete coronavírus humanos (HCoVs) com potencial de infectar os seres humanos, entre eles estão: HCoV229E, HCoV - OC43, HCoV - NL63, HKU1, SARS - CoV, MERS - CoV e SARS - CoV - 2.

O novo Coronavírus foi identificado como agente etiológico de casos de pneumonia de etiologia desconhecida ocorridos em dezembro de 2019, na província de Wuhan, na cidade de Hubei, China.(CHAKRABORTY et al., [s.d.]) Inicialmente foi classificado um novo Betacoronavírus sendo primeiramente nomeado como 19-nCoV. Porém após identificação viral e a identificação dos órgãos alvos o Comitê Internacional de Taxonomia (ICTV) – classificou em uma nova nomenclatura passando a ser: síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS- CoV-2) e a doença foi denominada: COVID-19 (do inglês *Coronavirus disease* 2019). (BENVENUTO *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020a) Na China nos anos de 2002 e 2003 foi identificado casos de SARS-CoV e, outra epidemia alguns anos depois, a MERS-CoV foi observada em países do Oriente Médio.(HABIBZADEH; STONEMAN, 2020; PEERI *et al.*, 2020)

O vírus SARS-CoV-2 pertence à família do *Coronaviridae*, ao subgênero *Sabercovirus* e gênero *Betacoronavirus* (ICTV,2020) (Fig.1). Os Betacoronavírus são originados do mesmo ancestral comum, que infectam morcegos. O SARS-CoV-2 possui uma semelhança de 88% com o genoma de dois outros betacoronavírus que são derivados de morcegos (bat-SL-CoVZC45 e bat-SL-CoVZXC21), sendo mais parecido filogeneticamente

com estas espécies do que com os vírus SARS-CoV (79% de semelhança) e do MERS-CoV (50% de semelhança). (TANG *et al.*, 2020)

Figura 1 - Classificação dos Coronavírus Humanos



Fonte: Baseado no *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*

O coronavírus é um vírus de RNA fita única e polaridade positiva, com forma esférica que recorda a aparência de “coroa”. A estrutura viral é composta por envelope (E), membrana (M), proteína da espícula (S), nucleocapsídeo (N) e RNA genômico. (LU *et al.*, 2020) A proteína da espícula S e proteína N do nucleocapsídeo dão estabilidade à partícula viral. Além disso, a proteína N está envolvida com a montagem do vírião, é uma proteína estrutural que desempenha uma ação fundamental na transcrição e montagem do vírus. (BENVENUTO *et al.*, 2020)

2.2 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo de multiplicação viral do SARS-CoV-2 ainda não é bem elucidado. Porém, segundo o trabalho de QIN *et al.*, 2020, há uma ligação entre a proteína S e os receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) das células respiratórias do hospedeiro. Segundo o trabalho, as proteases da superfície celular clivam a subunidade da proteína S, que faz a mediação da fusão do vírus com a membrana da célula. Isto gera uma série de mudanças conformacionais, resultando na fusão do vírus com a célula do hospedeiro e consequentemente a liberação do material genético do vírus. Depois da liberação do material

genético, o vírus utiliza o maquinário celular para fazer cópias do RNA viral, que serão posteriormente liberados para infectarem em outras células.(QIN *et al.*, 2020)

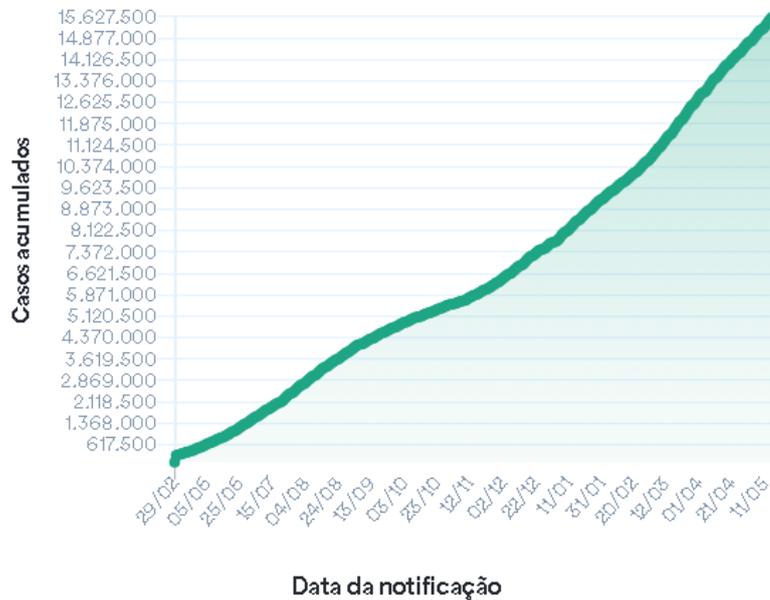
2.3 EPIDEMIOLOGIA DO SARS-CoV-2

No final de janeiro de 2020, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), havia notificados 2.798 casos de COVID-19 confirmados, sendo 98,7% dos casos presentes na China. (JIN *et al.*, 2020) Devido ao grande número de casos notificados, no dia 30 de janeiro de 2020 a OMS declarou que o surto do novo coronavírus se tratava de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) com intuito de interromper a propagação do vírus. Em 11 de março de 2020 a OMS anunciou a COVID-19 como uma pandemia, pois a distribuição geográfica da doença abrange por todo o mundo. ([“Histórico da pandemia de COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde”, 2020](#)).

No início da pandemia o aumento do número de casos era significativo na China, com sua rápida disseminação para outros países como Japão, Tailândia, Singapura, Estados Unidos da América e Alemanha.(WU; CHEN; CHAN, 2020) Segundo o documento da OMS, até o dia 22 de abril de 2020 o número total de casos de COVID-19 foi de 2.471.136 casos confirmados em todo mundo, com 169.134 morte. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020)Ao comparar com SARS e MERS, o SARS-CoV-2 se espalhou ligeiramente mais rápido, devido ao aumento da globalização e ao foco da epidemia, superando o número de casos e mortes pela doença.(PEERI *et al.*, 2020)

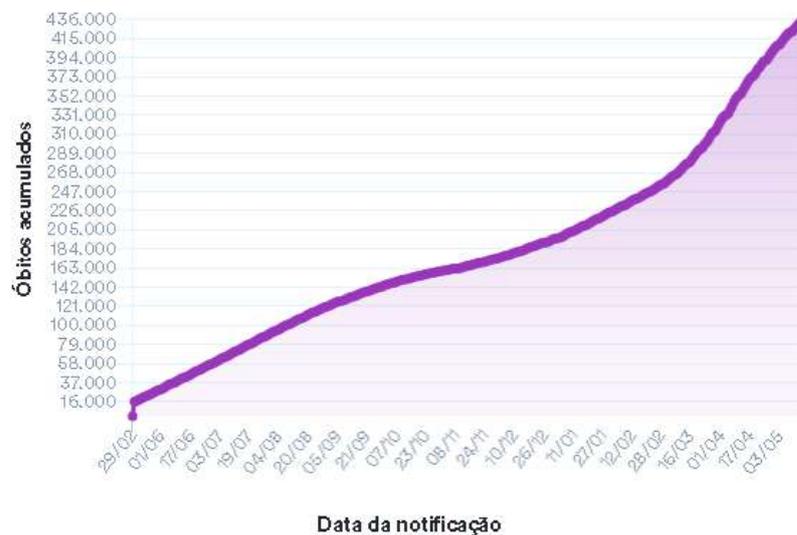
No Brasil em janeiro de 2020 a COVID-19 vinha sendo considerada uma epidemia de "perigo iminente", porem após a notificação de dez casos relevantes, foi considerado caso suspeito com exigência de atenção imediata. (Ministério da Saúde, Boletim 01, 2020) Entre o período de 18 de janeiro a 21 de fevereiro de 2020, ocorreram notificação de 51 casos suspeitos, com manifestação de sintomas leves e dentre estes 49 possuíam histórico de viagens à China. (Ministério da Saúde, Boletim 03, 2020) Assim, o Ministério da Saúde declarou COVID-19 como Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional. (Ministério da Saúde, Boletim 02, 2020) O Brasil foi o primeiro país na América Latina com caso de COVID-19 confirmado em 26 de fevereiro de 2020. (RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2020) Com diagnóstico confirmado do primeiro caso houve o aumento dos casos de COVID-19, desde então o número de casos a cada dia aumenta exponencialmente. Ao início do mês de março de 2021, o Brasil apresentava 13.599.994 casos confirmados (fig.2), 358.425 óbitos (fig.3), Incidência/100 mil habitantes de 6471,7 e mortalidade/100mil habitantes é de 170,6. (“Coronavírus Brasil”, 2021)

Figura 2 - Incidência de casos por COVID-19 no Brasil no período de fevereiro a abril de 2021



Fonte: <https://covid.saude.gov.br/>

Figura 3- Incidência de óbitos por COVID-19 no período de fevereiro a abril de 2021



Fonte: <https://covid.saude.gov.br/>

O município do Rio de Janeiro pode ser dividido em 160 bairros, com população estimada de 6.752.339 habitantes em 2020. (CAVALCANTE; ABREU, 2020; “Data Rio”, 2020) No Rio de Janeiro podemos observar desigualdades sociais, com um grande número de pessoas em pobreza extrema, que moram em conglomerados habitacionais podendo ter

dificuldade ao acesso a saúde de qualidade.(CAVALCANTE; ABREU, 2020) Em todo estado do RJ no ano de 2020 foram confirmados 212.090 casos, deste 41.970 tiveram casos graves, com 18.851 óbitos, a taxa de incidência foi de 3.183,9 por 100mil habitantes, a taxa de mortalidade é de 283,0 por 100 mil habitantes e com taxa de letalidade de 8,9. Enquanto que no município de Niterói no ano de 2020 foram confirmados 25.637 casos, com 1.092 óbitos, e com taxa de letalidade de 4,3. (“Painel Rio COVID-19”, 2021) Até o mês março de 2021, o estado do RJ teve 684.758 casos confirmados com 39.791 óbitos, Incidência/100mil habitantes de 3966,2 e 230,5 de mortalidade/100mil habitantes (“Coronavírus Brasil”, 2021), dentre estes dados no município de Niterói apresentava dados como: o número de casos confirmados de 31.244 e 941 óbitos. (“Painel Covid”, 2021)

2.4 FORMAS DE TRANSMISSÃO E SINTOMAS

A transmissão do SARS-CoV-2 inicialmente foi de origem zoonótica, sendo de baixa gravidade comparado a epidemia de SARS.(TANG *et al.*, 2020) Estudos mostram que mutações possam ter ocorrido devido à pressão seletiva positiva, conforme evolução da epidemia, podendo favorecer o aprimoramento da patogenicidade e transmissão desse novo vírus.(BEREKAA, 2021) O modo de transmissão acontece de pessoa a pessoa através do contato de gotícula de saliva, espirros, tosse e contato com superfícies contaminadas.(BENVENUTO *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2020)

O período de incubação médio da COVID-19 é de 3 a 5 dias , porém pode se estender até 20 dias após o contato, pode ser classificada com base na gravidade dos sintomas em doença leve, moderada, grave e crítica.(ZHOU *et al.*, 2020) Os sintomas mais comuns são febre (cerca de 85% dos casos), tosse (cerca de 80% dos casos) e falta de ar (30-50% dos casos). (BORDI *et al.*, 2020; GUAN *et al.*, 2020) Os pacientes com doença leve apresentam sintomas comuns de resfriado e a doença moderada pode apresentar quadros de febre e sintomas respiratórios.(GUAN *et al.*, 2020) Enquanto os pacientes graves podem apresentar dispneia e diminuição da saturação de oxigênio e os casos críticos se apresentam com insuficiência respiratória, choque séptico e insuficiência de múltiplos órgãos. (WANG *et al.*, 2020b; ZHANG *et al.*, 2020)

O estudo epidemiológico realizado na China apontou que dos 4.672 casos confirmados, 86,6% dos pacientes tinham entre 30 e 79 anos, sendo 13,8% casos graves e 4,7% casos críticos.(ZHOU *et al.*, 2020) Todavia, pacientes com comorbidades doença cardiovascular, diabetes, doença respiratória crônica, hipertensão e câncer) apresentaram

maiores taxas de mortalidade do que aqueles sem comorbidades. (HUANG et al., 2020; ZHANG et al., 2020)

2.5 DIAGNÓSTICO E ALTERAÇÕES LABORATORIAIS

O diagnóstico laboratorial é de suma importância para detectar a infecção COVID-19. Existem questões importantes no ramo do diagnóstico molecular nelas estão: a diminuição de resultados falsos negativos através da detecção de quantidades mínimas de RNA viral; evitar resultados de falsos positivos e otimizar testes rápidos para serem precisos e de alta capacidade num número grande de amostras em curto espaço de tempo.(BORDI et al., 2020; MOHAMADIAN et al., 2021; YIP et al., 2017)

O padrão ouro para o diagnóstico COVID-19 inicialmente era por meio do isolamento viral em tecido, porém está sendo substituído pela técnica de biologia molecular a RT-qPCR. (WANG et al., 2020b) O RT-PCR é uma reação de cadeia de polimerase que detecta o RNA viral por meio dos primers específicos. (CORMAN *et al.*, 2020a; JIN *et al.*, 2020)

Os protocolos mais utilizados pelo mundo ocidental para o RT-PCR de SARS-CoV-2 foram desenvolvidos por Charité, Hospital Germany (CORMAN et al., 2020b) e *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC (USA). (CDC, 2020) O protocolo de diagnóstico molecular para o COVID-19 se baseia na detecção de três marcadores: genes N, E e RdRP. Os ensaios para os genes E e N são destinados para os protocolos de triagem, pois detectam qualquer betacoronavírus associados ao morcego. Enquanto o gene RdRp é específico para coronavírus SARS (incluindo SARS-CoV-2). Na rotina se sugere fazer uma triagem com ensaio do gene N ou E, depois disto segue-se realizando testes confirmatórios com testes para o gene RdRp. (CORMAN et al., 2020a; MOHAMADIAN et al., 2021)

Os testes sorológicos são utilizados para vigilância epidemiológica, pois estes testes detectam anticorpos IgM e IgG específicos para o vírus na população já exposta e assintomática. Também pode ser utilizado em pacientes com infecção com carga viral baixa e RT-PCR negativo. (JIN et al., 2020; SBAC,2020) No COVID-19 tem sido observado que os anticorpos IgM e IgG surgem quase simultaneamente e podendo ter início aproximadamente após a primeira semana da infecção e sendo detectável a partir da segunda semana.(ZHAO et al., 2020) Sendo semelhante com a cinética de anticorpos de infecções por SARS-CoV. (HSUEH et al., 2004) Os títulos de anticorpos variam de acordo com a gravidade dos sintomas, sendo os níveis mais elevados nas infecções mais graves.(OKBA et al., 2020; YONGCHEN et al., 2020)

Os exames de tomografia computadorizada (TC) em pacientes com COVID-19 apresentam opacidades em vidro fosco múltiplas, bilaterais, posteriores e periféricas, com ou sem consolidação pulmonar e, em casos graves, sombras infiltrantes, essas características são semelhante a quadros de pneumonia viral. (BAI et al., 2020; CORMAN et al., 2020a) Entre os achados menos comuns compreendem o espessamento pleural, derrame pleural e linfadenopatia. A TC do tórax pode ser bastante útil ao diagnóstico, porém nenhum achado pode excluir a possibilidade de COVID-19 (BAI et al., 2020; DI GENNARO et al., 2020) Em análise de autópsia de um paciente COVID - 19 observaram o acúmulo de fluido e formação de membrana hialina nas paredes alveolares, podendo ser o principal fator patológico da opacidade em vidro fosco.(PAN et al., 2020)

Algumas evidências apontam que a TC de tórax no início dos sintomas pode apresentar taxa de detecção mais alta (aproximadamente 98%) ao comparar com a reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR) (aproximadamente 70%) nos pacientes infectados.(MOHAMADIAN et al., 2021) O estudo de Xie *et al.*(2020) evidenciaram que cerca de 3% dos pacientes não apresentam RT - PCR positivo, mas apresentam TC de tórax positiva; sendo assim ambos os testes são recomendados para pacientes COVID - 19. A TC de tórax, pode ter alta sensibilidade para diagnóstico imediato e monitoramento da progressão da doença em pacientes.(CORMAN et al., 2020b; MOHAMADIAN et al., 2021)

Alterações laboratoriais hematológicas e bioquímicas podem ser observadas em pacientes COVID-19 positivo conforme o quadro 1. As alterações mais frequentes são linfocitopenia, aumento da proteína C reativa (Ptn C reativa), aumento da albumina, da desidrogenase láctica (LDH), da aspartato aminotransferase (AST), e alanina aminotransferase (ALT) e da velocidade de hemossedimentação (VHS). (GAO et al., 2020; GUAN et al., 2020)

Quadro 1- Alterações laboratoriais em pacientes COVID-19

Hematológicas	
Aumento de dímero-D	Marcador de degradação de fibrina
Aumento do VHS	Marcador de detecção de inflamação e infecções
Leucocitose	Marcador de detecção de inflamação e infecções
Linfopenia	Marcador de detecção de inflamação e infecções
Microcitose	Alteração no tamanho dos eritrócitos
Plaquetopenia	Marcador de integridade vascular
Prolongamento do PT	Marcador de distúrbios de coagulação
Bioquímicas	
Aumento de bilirrubinas	Marcador de função hepática
Aumento de creatinina	Marcador de função renal
Aumento de cTn	Marcador de lesão cardíaca
Aumento de LDH	Marcador de lesões pulmonares
Aumento de Ptn C reativa	Marcador de fase aguda da reação inflamatória e infecção.
Aumento de procalcitonina	Marcador de resposta imunológica à infecção.
Diminuição da albumina	Marcador de fase aguda da reação inflamatória

LDH: lactato desidrogenase; Ptn C reativa: proteína C reativa; PT: tempo de protrombina; cTn: troponina cardíaca; VHS: velocidade de hemossedimentação. Fonte: SBAC,2020

2.6 TRATAMENTO DOS PACIENTES SARS-COV-2 INTERNADOS

O tratamento dos pacientes com SARS-CoV-2 é um grande desafio, mas existem diferentes abordagens terapêuticas sendo desenvolvidas. (LI; DE CLERCQ, 2020)A forma de tratamento depende da manifestação clínica que varia de quadros assintomático a quadros críticos com a necessidade de suporte a vida.(DHAMA et al., 2020)

Na tentativa de formular uma diretriz de tratamento para COVID-19 foram iniciados estudos para desenvolver novos agentes ou redirecionar medicamentos conhecidos como: Remdesivir, Oseltamivir, ASC09 F (inibidor de protease do HIV), Lopinavir, Ritonavir presentes nos estudos de fase I – III. (DHAMA et al., 2020; HABAS et al., 2020) Também vem sendo testadas para SARS-CoV-2 algumas drogas desenvolvidas para SARS-CoV e MERS-CoV.

Nos casos graves o uso de remdesivir vem se mostrando potencial agente antiviral de amplo espectro com alta eficácia para o tratamento de SARS-CoV-2.(ANKA et al., 2021) Para controle dos efeitos das complicações da COVID-19 podem ser utilizados corticoides, antimaláricos, anticoagulantes (eventos trombóticos), plasma convalescente. (HABAS et al., 2020)

2.7 VACINAS PARA COVID-19

No desenvolvimento de vacinas para o COVID-19, diversas estratégias estão sendo adotadas, como a utilização de vírus inativos ou vivos atenuados, partículas semelhantes a vírus (VLPs), vetores virais e baseados em proteínas, baseados em DNA e mRNA à base de vacinas. A maioria da candidata da vacinas vem apresentando como alvo a proteína da espícula viral que podem ser o principal indutor de anticorpos neutralizantes.(SHANG et al., 2020) Acredita-se que as vacinas baseadas na proteína S podem induzir anticorpos que bloqueiam a ligação ao receptor viral, e remoção do genoma do vírus.(DHAMA et al., 2020)

Normalmente o desenvolvimento de uma vacina pode se estender de 10-15 anos, porém com a rapidez no sequenciamento do gene SARS-CoV-2, o desenvolvimento para uma vacina eficaz logo avançou.(SHANG et al., 2020) Em junho de 2020, havia 124 vacinas candidatas para profilaxia da COVID-19 em desenvolvimento. Entretanto um número reduzido de vacinas candidatas entrara na fase 1, fase combinada 1/2 ou fase 2 dos ensaios clínicos em humanos adultos, podemos observar algumas vacinas em desenvolvimento e sua estratégia utilizada no quadro 2. (KOIRALA et al., 2020; O'CALLAGHAN; BLATZ; OFFIT, 2020)

Alguns estudos estão observando as vacinas já utilizadas podem ser reaproveitadas. Nos Estados Unidos da América, uma vacina oral contra a poliomielite vem sendo investigada como possível candidata. (BONTEN, 2021; MURDOCH CHILDRENS RESEARCH INSTITUTE, 2021; TASK APPLIED SCIENCE, 2020) Em países como Holanda, Austrália e África do Sul estão sendo realizados ensaios clínicos randomizados multicêntricos a respeito da administração da vacina BCG. (CURTIS et al., 2020) Já no Egito foi registrado um ensaio de vacina contra sarampo para a profilaxia de COVID-19. (KOIRALA et al., 2020)

Quadro 2 – Vacinas em desenvolvimento e suas respectivas metodologias

Local e desenvolvedor	Tecnologia
<i>Sinovac Life Science</i> (China)	Vírus inativado + hidróxido de alumínio
<i>AstraZeneca</i> e Universidade de Oxford (Reino Unido)	Vetor adenovírus (ChAdOx1)
Moderna/Biotech/ Pfizer (Estados Unidos)	Vacina de mRNA
Jassen- Johnson & Johnson (Estados Unidos)	Vetor adenovírus (Ad26)
<i>Sinopharm</i> – Instituto de produtos biológicos (China)	Vírus inativado (Células Vero)
Curevac- (Bélgica)	Vacina de mRNA
Novavax (Estados Unidos)	Subunidade de proteína de matrix +adjuvante
Vaxine PTY Ltd (Australia)	Subunidade de proteína da espícula +adjuvante
<i>Clover Biopharmaceuticals/GSK e Dynavax</i> (China)	Subunidade de proteína recombinante da espícula + adjuvante

Fonte: Adaptado de DAI; GAO, 2021; YADAV et al., 2020

2.8 COINFECÇÕES NOS PACIENTES COVID-19

A infecção pelo coronavírus SARS-CoV-2 pode evoluir para quadros mais graves com complicações de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), lesões cardíacas e infecções secundárias (bacteriana, fúngica, outros vírus).(CHEN et al., 2020) As coinfeções por outros patógenos (de origem viral, bacteriana e fúngica) são observadas em 50% entre os casos graves de COVID-19. (HASHEMI *et al.*, 2020; LAI; WANG; HSUEH, 2020a).

O diagnóstico diferencial de coinfeção para outros patógenos virais é imprescindível para os pacientes com infecção por COVID-19, pois ajudar a evitar o agravamento e a progressão das doenças ou mesmo até a morte do paciente.(LIN et al., 2020) Para diminuir a taxa de morbidade e/ou mortalidade da COVID-19 faz-se fundamental prestar atenção à possíveis coinfeções, garantindo um tratamento abrangente e seguro aos pacientes. (HUANG et al., 2020; ZHU et al., 2020)

2.9 VÍRUS DA FAMÍLIA *HERPESVIRIDAE*

Os Herpesvírus humanos (HHV) integram à família *Herpesviridae*, são vírus ubíquo, uma vez que a primo-infecção ocorra, esse vírus permanece em latência no organismo do indivíduo afetado durante toda a vida. (ROIZMANN *et al.*, 1992; ROMANOS; SANTOS; WIGG, 2015) Geralmente em indivíduos saudáveis estes vírus provocam infecções

frequentemente benignas, porém em indivíduos imunodeprimidos, a infecção pode causar manifestações clínicas de gravidade variada.(DEBAUGNIES *et al.*, 2014; FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007)

A família *Herpesviridae* pode ser dividida em 3 subfamílias (Alfaherpesvírus, Betaherpesvírus e Gamaherpesvírus). Todos os vírus desta família são vírus de DNA com cadeia dupla. As subfamílias se diferenciam pela sua patogenia e características virais e estruturais. (ROMANOS; SANTOS; WIGG, 2015) A subfamília Alfaherpesvírus é composta pelo Herpes simples tipo 1, Herpes simples tipo 2 e o vírus Varicela Zoster. Na subfamília Betaherpesvírus temos o citomegalovírus, Herpesvírus 6 e o Herpesvírus 7, já a Gamaherpesvírus temos o Epstein-Bar e o Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (HHV-8). (ROIZMANN *et al.*, 1992) O ciclo viral dos HHV é composto de 5 etapas, sendo estas a entrada do vírus na célula hospedeira, expressão dos genes virais, replicação do genoma viral, montagem da progênie e saída da célula hospedeira.(FLEMINGTON, 2001).

O diagnóstico laboratorial para os Herpesvírus pode ser realizado por meio do isolamento viral por cultura de células, da técnica da PCR e da sorologia.(DEBAUGNIES *et al.*, 2014; TANAKA *et al.*, 2009) A PCR é a mais realizada, devido à alta sensibilidade e especificidade, na detecção do genoma viral. Este método pode diferenciar as espécies e cepas virais. (RECHENCHOSKI *et al.*, 2017; SAFRONETZ; HUMAR; TIPPLES, 2003) Os testes sorológicos podem demonstrar infecção recente ou mesmo imunização prévia, estes podem ser realizados pelas técnicas de *Western blotting* (WB), ELISA e reação de imunofluorescência indireta (RIF), porém apresentam muita reação cruzada.(ANDERSON; BUCHAN; LEDEBOER, 2014; DOBEC *et al.*, 2008; ENGELMANN *et al.*, 2011)

2.9.1 Herpes simples tipo 1

O Herpesvírus simples tipo 1 (HSV-1) foi um dos primeiros Herpesvírus descrito na literatura, classificado na subfamília Alfaherpesvírus, gênero Simplex vírus. (ARDUINO; PORTER, 2007) A infecção primária pelo HSV-1 ocorre normalmente na fase da infância ou adolescência, com manifestações na região oral/facial. Esse vírus estabelece a latência no sítio dos gânglios trigêmeos.(WHITLEY; ROIZMAN, 2001) A transmissão viral é por meio do contato com gotículas respiratórias, saliva e secreções mucocutâneas de uma pessoa infectada.(ARDUINO; PORTER, 2007) A reativação do vírus latente ocorre através de diversos estímulos como estresse e imunossupressão. (OAKLEY; EPSTEIN; SHERLOCK, 1997)

A primo-infecção em 90% dos casos pode não apresentar manifestações clínicas, ocorrendo uma infecção assintomática, sendo detectável através da presença de anticorpos.(KOLOKOTRONIS; DOUMAS, 2006) Porém quando há sintomatologia pode se observar quadros de gengivoestomatite com presença de adenopatia regional, balanite, ceratoconjuntivite e herpes cutâneo.(LIMA et al., 2017) E podem ocorrer complicações como meningoencefalite herpética ou erupção variceliforme dependente do estado de imunossupressão. (ARDUINO; PORTER, 2007) • As infecções pelo HSV-1 pode ser tratado com aciclovir tópico, oral ou intravenoso ou outros antivirais como valaciclovir, famciclovir, foscarnet IV:e cidoclovir.O tratamento é recomendado ser iniciado na fase prodrômica da doença, devido a janela terapêutica estreita.(SIMMONS, 2002)

O diagnóstico laboratorial para HSV-1 pode ser realizado através de swab para estudo citológico,técnicas de sorologia e PCR.(ENGELMANN et al., 2011) O swab para estudo citológico é feito pelo método de Tzanck, uma técnica citológica que utiliza o raspado da base da vesícula na pele e coloração pela HE, a fim de pesquisar células gigantes multinucleadas com corpos de inclusão (vírions).(SIMMONS, 2002) Esse método possui baixa especificidade, pois não distingue o HSV de outras espécies de herpesvírus,feito em casos atípicos e pacientes imunocomprometidos.(ARDUINO; PORTER, 2007) A sorologia demonstra exposição anterior ao vírus é indicada quando houver queixas de desconforto genital ou labial recorrente, porém sem presença de lesões.(KOLOKOTRONIS; DOUMAS, 2006; WHITLEY; ROIZMAN, 2001)

2.9.2 Vírus Varicela Zoster

O Vírus Varicela Zoster (VZV, também chamado de Herpesvírus 3) teve seu genoma de DNA descrito por SCOTT & DAVISON, 1986. Esse vírus infecta os humanos através do ar e contato com as lesões cutâneas de um indivíduo infectado, o sítio alvo viral são linfócitos T, células epiteliais e os gânglios.(JIH *et al.*, 2009)

A infecção primária causa a varicela (catapora), posteriormente o VZV torna-se latentes nos neurônios ganglionares.(MAIA *et al.*, 2015) Fatores como estado imunossupressão, avanço da idade podem contribuir com a reativação do VZV causando o herpes zoster, com complicações como: dor crônica (neuralgia pós-herpética-NPH), distúrbios neurológicos, oculares graves, viscerais e gastrointestinais múltiplos.(JUNG *et al.*, 2004; LAI *et al.*, 2016)

Existe uma vacina atenuada para o VZV formulada no Japão em 1974, para imunização de crianças menores de 12 anos. A vacina é autorizada para uso em alguns países

do mundo, abrangendo Austrália, Brasil, Canadá, China, Alemanha, Grécia, Israel, Itália, Japão, Uruguai, Catar, Coreia do Sul, Espanha e Taiwan. (MARIN *et al.*, 2007)

Inicialmente, o tratamento é realizado com a administração de antivirais e analgésicos, nas primeiras 72 horas após o diagnóstico, com o objetivo de reduzir a duração e intensidade da dor (ARVIN, 1996; KOSHY *et al.*, 2018; SCHMADER, 2018) Já foi observado que o tratamento com Aciclovir, Valaciclovir e Fanciclovir, pode acelerar o processo de cicatrização das lesões cutâneas e mucosas.(GERSHON *et al.*, 2015; HAYDEN *et al.*, 2016) Porém neuropatia pós-herpética vem sendo tratada de diversas maneiras, incluindo analgésicos, narcóticos, antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, estimulação nervosa elétrica percutânea, bloqueio nervoso e anestésicos tópicos.(GARCÍA-GONZÁLEZ; ROSAS-CARRASCO, 2017; JUNG *et al.*, 2004)

O diagnóstico do vírus varicela zoster inicialmente pode ser realizado baseado na observação do quadro clínico, porém se a infecção/reativação do VZV não apresentar nenhuma erupção cutânea requerem confirmação virológica. (GILDEN *et al.*, 2010) Para a identificação virológica requer técnica de detecção de carga viral PCR e sorologia IGM anti-VZV positiva. (GERSHON *et al.*, 2015)

2.9.3 Vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr (EBV ou HHV-4) é um vírus de DNA linear, com 172 quilobases, que codifica aproximadamente 100 proteínas virais, seu genoma situa-se dentro de um envelope. (SCHEFFEL *et al.*, 2015) O EBV é um vírus oncogênico, pode causar o carcinoma de nasofaringe, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin e linfoma de células B difusas.(FATTAL *et al.*, 2014) A transmissão do EBV ocorre principalmente pela saliva, no entanto pode haver transmissão por meio de hemoderivados e órgãos transplantados.(EVANS, 1972; LOSSIUS *et al.*, 2012)

Este vírus é extremamente comum, apresentando anticorpos para quase 90% da população na fase adulta. (KERR, 2019; RASMUSSEN *et al.*, 2015) Nos países desenvolvidos, a primo-infecção ocorre, geralmente, na adolescência ou até mesmo na fase adulta, causando a mononucleose infecciosa, que é uma doença linfoproliferativa.(DUNMIRE; VERGHESE; BALFOUR, 2018) Porém nos países em desenvolvimento, geralmente a infecção primária ocorre nos primeiros cinco anos de vida.(KERR, 2019) O número de casos na infância é maior do que o número de casos na adolescência e na fase adulta, e, principalmente, nas regiões sem saneamento básico e de alta

densidade populacional.(EVANS, 1972) O Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária. (EVANS, 1972; KAFUKO *et al.*, 1972)

Nos pacientes imunossuprimidos causa infecção oportunista, sendo realizado diagnóstico para monitoramento. As manifestações clínicas da infecção EBV incluem anemia, trombocitopenia, linfadenopatia, rash, pneumonia, síndrome hemofagocítica e linfoma.(COHEN, 2009; LAU *et al.*, 2017)

O tratamento para EBV nos casos de imunodepressão, necessita da administração de drogas, como o Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet, Corticoides orais, como Prednisona. (CARBONE; GLOGHINI; DOTTI, 2008; POOLE; JAMES, 2018)O uso de corticoesteroides devem ser administradas com precaução. Em caso de envolvimento tonsilar, deve-se evitar Ampicilina ou Penicilina devido à alta prevalência de erupções cutâneas. (KERR, 2019)

O diagnóstico laboratorial para o EBV pode ser feito por meio da serologia, do RT-qPCR, de biópsia utilizando técnica de hibridização *in situ*.(NILLER; BAUER, 2017; OKANO *et al.*, 2005) As técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou a PCR quantitativa (qPCR) são realizadas no diagnóstico e o prognóstico das infecções por EBV em amostras de sangue e/ou soro.(KARADAĞ GEÇGEL *et al.*, 2012; LUDERER *et al.*, 2005; NILLER; BAUER, 2017) Enquanto que a técnica de imunofluorescência e ensaios imunoenzimático (ELISA) podem detectar anticorpos específicos induzidos pelo EBV.(DEVANTHÉRY; MEYLAN, 2010; NYSTAD; MYRMEL, 2007; OKANO *et al.*, 2005)

2.9.4 Citomegalovírus Humano

O Citomegalovírus humano (HCMV) é um vírus membro da família *Herpesviridae*, de DNA cadeia dupla de aproximadamente 236 kpb, apresenta soroprevalência mundial entre 55 a 100%. (SCHEFFEL *et al.*, 2015) Posteriormente a infecção primária, o genoma dos Herpesvírus persiste no corpo ao longo da vida, em determinadas células entrando em período de latência. Esse período pode ser interrompido pela reativação da infecção devido a vários fatores. A reativação do vírus permite sua disseminação com replicação ativa e o aumento da carga viral, uma vez que se verifica liberação de vírions extracelulares. (CROUGH; KHANNA, 2009; HAGE *et al.*, 2017)

Cerca de 90% da população mundial apresenta infecções causadas por algum vírus da família *Herpesviridae*. Nos indivíduos imunocompetentes, a infecção causada pelo HCMV é, em sua maioria, assintomática. (LACHMANN *et al.*, 2018)Em imunossuprimidos, o Herpesvírus reativa podendo causar doença grave, o que leva o aumento da morbidade e

mortalidade desses indivíduos. (HAGE *et al.*, 2017) A infecção por HCMV pode apresentar manifestações clínicas/ laboratoriais como: citopenia, nefrite, pneumonia, retinite, colite e úlceras no esôfago. (CROUGH; KHANNA, 2009; HAGE *et al.*, 2017)

Como primeira escolha para o tratamento de infecção / reativação por CMV estão os compostos antivirais como: Ganciclovir (GCV), Foscarnet (FOS) e Cidofovir (CDF), porém estes possuem muitos efeitos colaterais. (JUNG; DORR, 1999; RAZEGHI *et al.*, 2007; RAZONABLE; PAYA, 2004) Novos medicamentos anti-CMV vem sendo investigados em ensaios clínicos randomizados de fase II e III, podendo serem promissores são estes: Maribavir, Letermovir e Brincidofovir ambos não apresentam propriedades mielossupressoras ou efeitos tóxicos renais. (MAFFINI *et al.*, 2016) O diagnóstico laboratorial do HCMV é obtido por técnicas diferentes, como PCR, antigenemia pp65 (monitoramento precoce da fosfoproteína 65). (LINO *et al.*, 2018; TOMTISHEN III, 2012)

2.9.5 Herpesvírus 6

O Herpesvírus 6 pertence ao gênero *Roseolovírus*, é conhecido por causar roséola infantil, convulsões febris e outras síndromes febris em crianças, tem sua replicação viral em linfócitos T. Sua aquisição é principalmente sintomática, principalmente na infância, resultando em febre alta, diarreia, prurido e erupção cutânea súbita (SE). (ABLASHI *et al.*, 2014) Na infecção primária, pode causar convulsões febris, encefalite ou convulsões. Os sintomas têm duração média de 9 dias, podendo causar uma síndrome semelhante à mononucleose infecciosa causada pelo EBV. (GÉRAUDIE *et al.*, 2012) Esse vírus pode causar uma infecção congênita, que é assintomática e não apresenta complicações para a criança. (CLARK; GRIFFITHS, 2003)

As reativações pelo Herpesvírus 6 causam manifestações cutâneas (pitiríase rósea) e doença de Kawasaki principalmente em crianças. (AGUT *et al.*, 2017) Os fatores de risco para reativação do Herpesvírus 6 podem incluir: idade avançada, condições imunossupressoras, fatores ambientais, como estresse. (ABLASHI *et al.*, 2014) Nos casos de transplante de células-tronco, transplante de órgão sólido ou imunossupressão por outras causas, a reativação viral é comum, mas assintomática na maioria dos casos, em outros pode causar encefalite ou doença grave em outros órgãos. (CLARK, 2002)

Infecções por herpesvírus 6 possuem manifestações clínicas geralmente leves e não requerem terapia. (ELIASSEN; HEMOND; SANTORO, 2020) Entretanto para o tratamento de infecção/reativações de HHV-6 há algumas recomendações, porém não há diretrizes padrão amplamente adotadas contendo abordagens de tratamento ideais. (PRICHARD;

WHITLEY, 2014; TOMBLYN et al., 2009) Mas drogas virais anti-CMV como ganciclovir, aciclovir, foscarnet e cidofovir parecem ter ação de inibição da replicação viral de maneira eficiente. (DE CLERCQ; NAESENS, 2006; REYMEN et al., 1995)

O diagnóstico laboratorial de HHV-6 pode ser feito por meio de cultura, sorologia e reação em cadeia de polimerase (PCR). (AGUT *et al.*, 2017) Em adultos, 95% têm sorologia positiva para HHV-6. (CLARK, 2002; YAMANISHI *et al.*, 1988) A cultura viral do HHV-6 pode ser realizada na fase aguda isolado a partir de PBMC de doentes com exantemas. (YAMANISHI *et al.*, 1988) O DNA do HHV-6 pode ser detectado na saliva, em esfregaços de garganta e na mucosa nasal de crianças e adultos. A PCR detecta o DNA do HHV-6 tem sido utilizado no diagnóstico de receptores de transplantes de órgãos sólido. (SEDLAK *et al.*, 2014)

3 JUSTIFICATIVA

Diante da situação de pandemia que está se vivenciando, o diagnóstico de COVID-19 e o diagnóstico diferencial para possíveis coinfeções é de suma relevância. Com o agravamento do quadro clínico por conta da infecção por SARS-CoV-2, lesões pulmonares, renais e/ou no trato gastrointestinal, podem ser um fator de risco para desenvolvimento de coinfeções (bacterianas, virais e fúngicas).

Com a sobrecarga das células imunes associadas com comorbidades pré-existentes (diabetes, doenças autoimunes, uso de imunossupressores) pode ocorrer deficiências na capacidade de eliminação de patógenos, podendo desencadear reativação de vírus em latência. Os Herpesvírus são agentes infecciosos oportunistas, acomete principalmente imunossuprimidos, promovendo aumento na morbidade e mortalidade. Sendo assim, o estudo da prevalência de coinfeção por Herpesvírus pode auxiliar ao tratamento e manejo clínico dos pacientes críticos. Além disso, alguns estudos demonstraram uma prevalência elevada de reativação de Herpesvírus nos pacientes internados em unidades de Terapia Intensiva.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de coinfeção por Herpesvírus em pacientes internados com COVID-19, relacionando-o com a mortalidade.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Rastrear casos suspeitos de COVID-19 internados no HUAP.
- Determinar a frequência de coinfeção de Herpesvírus por meio de qPCR em amostras de pacientes internados com COVID-19;
- Caracterizar e correlacionar os achados clínico-laboratoriais com a coinfeção por Herpesvírus e COVID-19;
- Verificar se a presença de coinfeções por Herpesvírus é um fator preditor de agravamento do quadro clínico;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, longitudinal, a partir de amostras de sangue total e amostras do trato respiratório (*swabs* /aspirado traqueal) que foram coletadas de uma série de casos de pacientes internados no HUAP no período de abril a julho de 2020. Todos os pacientes encontravam-se internados, e evoluíram para o quadro de insuficiência respiratória, com necessidade de graus progressivos de suporte, até intubação orotraqueal e a adaptação do paciente à ventilação mecânica.

5.2 LOCAL DO ESTUDO

As amostras e os dados dos prontuários foram coletados no HUAP e os experimentos foram realizados no Laboratório Multiusuário de Apoio a Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas (LAMAP).

5.3 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Pacientes internados no Hospital Universitário Antônio Pedro, maior de 18 anos e independente do gênero.

5.4 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Não houve critério de exclusão.

5.5 COLETA DAS AMOSTRAS

Com base nas diretrizes do Ministério da Saúde e do Centro de Controle de Doenças (CDC), está previsto a coleta de material das vias respiratórias superiores e/ou inferiores para o exame diagnóstico do SARS-CoV-2. Desta maneira foram coletados *swabs* de nasofaringe/aspirado traqueal para detecção do material genético viral, que foram enviados ao LAMAP. Além disso, material biológico (sangue total, soro e plasma) foram coletados para exames próximo da data da admissão, enviados ao Serviço de Patologia Clínica (SPC). Após a realização dos exames prescritos pela equipe médica, quando possível, foram recolhidas alíquotas para serem armazenadas em biorrepositório, e para as análises do presente estudo.

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Federal Fluminense número CAAE nº. 30623520.5.0000.5243. O Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) foi explicado de forma clara e detalhado aos participantes selecionados para pesquisa, e estes foram incluídos no estudo após assinatura do TCLE.

Os pesquisadores dessa pesquisa têm o compromisso de atuar no decorrer do trabalho segundo as diretrizes e as normas da Resolução CNS nº 466/12, que regulamenta as pesquisas

com seres humanos, a metodologia que será empregada foi planejada visando proporcionar condições que não gerem efeitos negativos aos participantes. As amostras estão mantidas em biorrepositório no LAMAP/HUAP segundo a Resolução CNS 441/2011 durante a pesquisa e serão descartadas após o término desta.

5.6 ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

As amostras do trato respiratório superior e inferior foram mantidas refrigeradas (4 a 8 °C) e enviadas ao LAMAP, onde foram processadas dentro de 24 a 72 h após a coleta. Se as amostras não pudessem ser enviadas dentro desse período, recomendou-se o congelamento a -80°C. A embalagem para o transporte de amostras de casos suspeitos de COVID-19 seguiu os regulamentos de remessa para Substância Biológica UN 3373, Categoria B (OPAS, 2019).

5.7 AVALIAÇÃO CLÍNICA, HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA

A avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e radiológicos foi baseada a partir dos exames de realizados na rotina laboratorial no SPC, HUAP/UFF. Com relação aos resultados de exames laboratoriais assistenciais do HUAP, o acesso aos dados foi via consulta dos prontuários dos pacientes internados e, ao final, foi montado um banco de dados para as análises estatísticas dos parâmetros. Para a coleta destes dados foi elaborado uma ficha para preenchimento, conforme Apêndice 1. As coletas de dados laboratoriais foram obtidas em três tempos para análise T0 (na admissão), T1 (7 dias após a admissão) e T2 (14 dias após a admissão).

5.8 INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO VIRAL

5.8.1 Extração e quantificação de RNA

Para o isolamento do RNA viral foi utilizado o QIAamp RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Adicionamos 140 µL de amostra respiratória no tampão de lise, homogeneizamos aguardamos 10 minutos. Adicionamos 560 µL de etanol homogeneizamos e colocamos na coluna centrifugamos. Colocamos o buffer AW1 centrifugamos, após adicionamos o buffer AW2 e centrifugamos, e seguida eluimos as amostras com 80µL da solução AE.

5.8.2 Real-time PCR (RT-qPCR) para detecção do SARS-CoV-2

As reações de RT-qPCR foram baseadas no protocolo do *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC (USA), sendo realizadas utilizando como alvo os genes N1 e N2 SARS-CoV-2, além disso o gene humano RNAase P (controle interno). As reações foram

realizadas utilizando os primers e sondas IDT (lote # 0000510908) e GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (catálogo Promega No A6121), o mix com 20 µL constituído de 10 µL de GoTaq®qPCR Master Mix- 2X (com CXR), 1,5 µL do Mix de Primers e Sonda 2019-nCov, 0,4 µL GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR- 50X, 3,1 µL água livre de nuclease e 5 µL de RNA extraído. A reação foi feita no equipamento 7500 systems (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Os dados de ciclagem estão representados no quadro 3.

Quadro 3- Ciclagem de amplificação do RT-qPCR SARS-CoV-2

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
Transcriptase Reversa	1	45°C	15 minutos
Ativação RT e Gotaq HotStart	1	95°C	2 minutos
Desnaturação	40	95°C	3 segundos
Anelamento e Extensão		55 °C	30 segundos

Segundo o protocolo do CDC o limite de detecção do teste deve ser estabelecido por cada laboratório levando em consideração todas as variáveis. Portanto foi estabelecido o cut-off de Ct < 38, dependendo do perfil da curva de amplificação. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os critérios descritos no quadro 4.

Quadro 4 – Interpretação dos resultados

2019 nCoV_N1	2019 nCoV_N2	RP	Interpretação dos resultados
+	+	±	Detectado
-	-	±	Não detectado
Apenas uma região positiva		±	Inconclusivo
-	-	-	Resultado Inválido

Quando os resultados do RT-PCR com os alvos N1 e N2 davam indeterminado, ou seja, só amplificava um alvo com CT menor ou igual a 38, realizamos um RT-qPCR com o Kit de Biomanguinhos com alvo para o gene E, seguindo os protocolos do fabricante. O limite de detecção do kit E é de 50 cópias/ reação.

5.8.3 qPCR para HSV1, Epstein-Bar e Herpesvírus-6

As reações de qPCR para os respectivos vírus HSV1, EBV e HHV-6 foram feitas a partir de amostras de nasofaringe extraídas. Com sequências de primers e sondas para cada região dos vírus (quadro 5), conforme previamente descrito nos protocolos de Sassenscheidt *et al.*, 2006 (HHV-6 – região U56), Fellner *et al.*, 2014 (EBV- região EBNA), Weidmann, Armbruster e Hufert, 2008 (HSV1- região UL39). A reação foi realizada com o kit AgPath-ID PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA) contendo 20 µl de mix, a mistura é composta por 1 µL de enzima PCR 25x (Mix Life Technologies, Califórnia, EUA), 2,5 µL de cada oligonucleotídeo (1 µM), Sonda 2, 0 µL (0,4 µM) e 12,5 µL de tampão de PCR 1x (Life Technologies, Califórnia, EUA). A quantificação absoluta foi realizada com base na curva padrão sintética segundo os trabalhos de Raposo *et al.*, 2017 (quadro 6). Na placa de 96 poços foi posta a mistura de PCR e a amostra extraída, colocamos a placa no equipamento para realização do PCR em tempo real. O equipamento utilizado foi o 7500 Real Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e método utilizado foi o de sonda de hidrólise, sistema Taqman, termociclagem evidenciada no quadro 7.

Quadro 5 - Sequências de primers, sondas utilizadas na qPCR para detecção e quantificação dos Herpesvírus

	Sonda - Sequência (5'-3')	Oligonucleotídeos - Sequência (5'-3')
HSV-1	FAM- CCATACCGACCACACCGACGAACC-MGB*	Senso- CCAAGTGCACCATGATCATCGA Antisenso- GATGTTTGTCCACCGCAACGAA
HHV-6	VIC- TTAGATGGTGGTGAGCTGGGATCGGT	Senso- AAAGACCTAAATTGCCGCTACCT Antisenso- GCAAGCTCATGAACATCGTCA
EBV	FAM- TGCAGCTTTGACGATGG-MGB*	Senso- CCGCTCCTACCTGCAATATCA Antisenso- GGAAACCAGGGAGGCAAATC

*Sonda MGB marcada com o fluoróforo FAM contendo *quencher* sem fluorescência

Quadro 6 - Sequência da curva padrão sintética utilizado no PCR para quantificação dos Herpesvírus

Herpesvírus	Curva padrão sintética - Sequência (5'-3')
HSV-1	ttcgtGATGTTTGTACCCGCAACGAAcgtatGACGTGGTGCGCG GGatgcgtTCGATGATCATGGTGCAGTTGGctgata
HHV-6	ttcgtGCAAGCTCATGAACATCGTCAcgtatACCGATCCCAGCT CACCACCATCTAAatgcgtAGGTAGCGGCAATTTAGGTCTTT ctgata
EBV	ttcgtGGAAACCAGGGAGGCAAATCcgatCCATCGTCAAAGC TGCAatgcgtTGATATTGCAGGTAGGAGCGGctgata

Quadro 7- Termociclagem referente à PCR em tempo real para detecção e quantificação dos Herpesvírus

Atividade	Temperatura	Tempo	
Ativação da UNG*	50°C	2 minutos	
Desnaturação e Ativação da enzima	95°C	10 minutos	
Desnaturação	95°C	15 segundos	} 40 ciclos
Hibridização e Extensão	60°C	1 minuto	

* UNG: Uracil-N-glicosilase

5.8.4 Extração de DNA

Amostras foram extraídas a partir de 200 µL de sangue total com QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração e qualidade do RNA total extraído foram verificadas em espectrofotômetro (Denovix[®], Delaware, EUA).

5.8.5 qPCR para Citomegalovírus

Para o qPCR foi utilizado o kit XGEN MASTER DNA/CMV (Biometrix Diagnóstica, Paraná, Brasil), que detecta do gene UL 54 (proteína de replicação viral, pp65), seguindo o protocolo do kit utilizando o termociclador 7500 (Applied Biosystems, EUA). Os resultados das amostras são referidos a 1 mL de amostra multiplicando o valor obtido por reação com um fator que leva em conta o volume da amostra de partida para a extração, o volume de eluição final, e o volume de DNA utilizado para amplificação por PCR e classificado como cópias/ mL. O limite de detecção do ensaio é de 0,57 cópias/ μ L.

5.8.6 qPCR para Varicela Zoster

As reações de qPCR para o VZV foram feitas a partir de amostras de sangue total extraídas. As sequências de primers e sondas para região pol. do vírus, a curva padrão sintética utilizadas no PCR estão descritas na tabela 4. Para a reação, utilizou-se o kit AgPath-ID PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA) contendo 20 μ l de mix a mistura é composta por 1 μ L de enzima PCR 25x (Mix Life Technologies, Califórnia, EUA), 2,5 μ L de cada oligonucleotídeo (1 μ M), Sonda 2, 0 μ L (0,4 μ M) e 12,5 μ L de tampão de PCR 1x (Life Technologies, Califórnia, EUA). Em seguida, a mistura foi posta na placa específica de 96 poços, sendo colocada no equipamento para realização do PCR em tempo real. O equipamento utilizado foi o 7500 Real Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e método utilizado foi o de sonda de hidrólise, sistema Taqman, termociclagem evidenciada no quadro 8.

Quadro 8 - Sequência primers, sonda e curva padrão para detecção e quantificação do PCR de Varicela Zoster

VZV	Sequência (5'-3')
Sonda	NED 5'- ATTCAGCAATGGAAACACACGACGCC-3'MGB
Oligonucleotídeos	Senso- CGGCATGGCCCGTCTAT
	Antisenso- TCGCGTGCTGCGGC
Curva padrão sintética	cgataTCGCGTGCTGCGGCgctatGGCGTCGTGTGTTTCCATTGC TGAATcgtgcATAGACGGGCCATGCCGtactg

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais foram avaliadas utilizando-se o teste do qui-quadrado (X^2), teste t de Student e teste de Mann Whitney. Para a análise longitudinal pareada utilizamos ANOVA e o teste de Friedman. O nível de significância estatística foi considerado quando o valor de p for menor que 0,05, e foi utilizado o intervalo de confiança a 95%. O banco de dados utilizado para a entrada e a análise dos dados do estudo foi realizado no programa estatístico Graphpad Prism® v.8.0 (Graphpad inc., San Diego, CA)

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO SARS-COV-2 POSITIVO

No período de abril a julho de 2020 foram realizados 250 RT-qPCR para detecção do SARS-CoV-2 em casos suspeitos, dentre eles 117 foram positivos. Conseguimos amostras de sangue total de 60/117 pacientes, os quais tinham concomitantemente amostras do trato respiratório, e onde realizamos PCR para alguns dos Herpesvírus.

Na tabela 5 está descrito as características da população dos pacientes hospitalizados do Hospital Universitário Antônio Pedro. A média de idade foi de 60,1 anos, e o sexo masculino foi predominante nessa população. As comorbidades observadas foram: doença cardiovascular 41 (68,3%), câncer 38 (48,7%), diabetes 22 (33,3), imunossupressão 12 (20 %) e doença renal crônica 11 (18,3%). O RT-qPCR de SARS-CoV-2 foi realizado em média 6 dias após o início dos sintomas. Os sintomas mais frequentes foram: febre 36 (60%), tosse 30 (50%), dispneia 27 (45%) e saturação de O₂ < 95% em 25 pacientes (41,6%). Em 60% dos envolvidos na pesquisa houve a necessidade de terapia intensiva, tendo suporte respiratório invasivo (intubação) em 56,7 % dos casos.

Na tomografia computadorizada 56,7% (34) dos pacientes internados tiveram padrão de vidro fosco, 16,7% tiveram entre 25 e 50 % de acometimento pulmonar e 31,7% tiveram acometimento pulmonar >50%, caracterizando o quadro clínico de moderado à crítico. Os pacientes internados, além do quadro de pneumonia causado pela COVID-19, apresentaram Insuficiência Renal Aguda 27/60 (45%), Sepses 25/60 (41,7%) e Coagulopatias 4/60 (6,7%).

6.2 COINFECÇÃO DE HERPESVÍRUS EM INDIVÍDUOS SARS-COV-2 POSITIVOS

A prevalência de coinfeção SARS-CoV-2/Herpesvírus foi de 27/60 (45%). A coinfeção mais prevalente foi SARS-CoV-2/EBV, encontrado em 15 pacientes (25%) seguido pelo SARS-COV2/HHV-6, em 13 (21,6%), cinco (8%) pacientes com CMV, dois (3,3%) pacientes com VZV, um paciente (1,6%) com HSV- 1. Identificamos 9 pacientes com coinfeção com dois Herpesvírus além do SARS-CoV-2, cinco pacientes apresentaram simultaneamente EBV/HHV-6, dois pacientes EBV/VZV, um paciente EBV/CMV e um paciente EBV/VZV (tabela 1).

Tabela 1- Características clínica e demográficas de pacientes hospitalizados com COVID-19
(Hospital Universitário Antônio Pedro, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil)

Parâmetros	Total n = 60
Idade, anos (média ± SD)	60,1 ± 18,65
Masculino, n (%)	37 (61,6)
Comorbidades, n (%)	
Câncer	38 (48,7)
Doença cardiovascular	41 (68,3)
Diabetes	22 (33,3)
Status Imunossupressão	12 (20,0)
Doença renal crônica	11 (18,3)
Tempo entre sintomas e RT-PCR, dias (média ± SD)	6,86 ± 7,07
Febre	36 (60,0)
Dispneia	27 (45,0)
Tosse	30 (50,0)
Hipoxia	25 (41,6)
Fadiga	18 (30,0)
Anosmia/ageusia	7 (11,6)
Diarreia	7 (11,6)
Complicações relacionadas à COVID-19, n (%)	
Necessidade de cuidados intensivos	36 (60,0)
Ventilação mecânica invasiva	34 (56,7)
Insuficiência Renal Aguda	27 (45,0)
Sepse	25 (41,7)
Coagulopatias	4 (6,7)
Positividade de coinfeção por Herpesvírus	
SARS-CoV-2 e EBV	15 (25,0)
SARS-CoV-2 e HHV-6	13 (21,6)
SARS-CoV-2 e CMV	5 (8,0)
SARS-CoV-2 e VZV	2 (3,3)
SARS-CoV-2 e HSV-1	1 (1,6)
SARS-CoV-2 e EBV/ HHV-6	5 (8,3)
SARS-CoV-2 e EBV/CMV	1(1,6)
SARS-CoV-2 e EBV/VZV	2 (3,3)
SARS-CoV-2 e CMV/HHV-6	1 (1,6)

Dados são apresentados por n (%).

O *status* de imunossupressão mostrou influência na prevalência de coinfeções virais, desta maneira, quanto mais imunossuprimidos os pacientes se encontravam maior foi a

suscetibilidade de manifestar uma coinfeção pelos Herpesvírus (tabela 2). Dos imunossuprimidos 6/12 (50%) apresentaram respectivamente EBV ($p=0,02$), HHV-6 ($p=0,003$), 3/12 (25%) pacientes com EBV e HHV-6 ($p=0,01$), 2/12 (16,6%) pacientes com CMV ($p=0,24$) 1/12 (8,3%) apresentou respectivamente EBV e VZV; CMV e HHV-6 ambos com $p=0,04$ e VZV ($p=0,28$).

Tabela 2 - Distribuição das coinfeções virais de acordo com o estado de imunossupressão

Herpesvírus	Imunossupressão		P-valor
	Não n= 48	Sim n= 12	
VZV	1(2,1)	1 (8,3)	0,28
EBV	9 (18,5)	6 (50,0)	0,02*
CMV	3 (6,2)	2 (16,6)	0,24
HHV-6	6 (12,5)	6 (50,0)	0,003*
EBV e VZV	0	1 (8,3)	0,04*
CMV e HHV-6	0	1 (8,3)	0,04*
EBV e HHV-6	2 (4,1)	3 (25,0)	0,01*

Dados são apresentados por n (%). P valor calculado pelo teste de qui-quadrado

No grupo de coinfeção, tiveram síndrome respiratória aguda (SARS) 15 (42,8%) pacientes, insuficiência renal aguda (IRA) em 13 (48,1%), sepse foi observada também em 13 (48,1%) pacientes e a necessidade de cuidados de terapia intensiva/Intubação estava presente em 18 (41,9%) dos pacientes. Em média, o tempo de internação entre os grupos com coinfeção por Herpesvírus foi de $27,22 \pm 25,47$ e sem coinfeção foi de $25,59 \pm 18,89$ dias.

Na distribuição de coinfeção pelos Herpesvírus e as complicações (Tab.3), observamos que não houve diferença significativa entre os grupos com e sem SARS: EBV ($p=0,65$), CMV ($p=0,30$), HHV-6 ($p=0,71$), EBV e CMV ($p=0,39$), CMV e HHV-6 ($p=0,39$) e EBV e HHV-6 ($p=0,93$). Nos grupos de com e sem Sepse também não houve diferença significativa: EBV ($p=0,65$), CMV ($p=0,81$), HHV-6 ($p=0,17$), EBV e CMV ($p=$), CMV e HHV-6 ($p=0,26$) e EBV e HHV-6 ($p=0,81$). Porém, na avaliação do grupo com IRA, observamos diferença nos pacientes com a presença de SARS-COV-2/HHV6 ($p=0,04$), enquanto que nas outras coinfeções não foram encontradas diferenças significativas: EBV ($p=0,88$), CMV ($p=0,48$), EBV e CMV ($p=0,26$), CMV e HHV-6 ($p=0,26$) e EBV e HHV-6 ($p=0,10$). Quando comparamos a necessidade estar ou não no ambiente de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e a necessidade de intubação orotraqueal com as coinfeções dos Herpesvírus

também não foram encontradas diferenças significativas: HHV-1(p=0,52), EBV (p=0,43), CMV (p=0,66), HHV-6 (p=0,82), EBV e CMV (p= 0,52), CMV e HHV-6 (p=0,52) e EBV e HHV-6 (p=0,19).

Tabela 3- Distribuição das coinfeções virais de acordo com as complicações

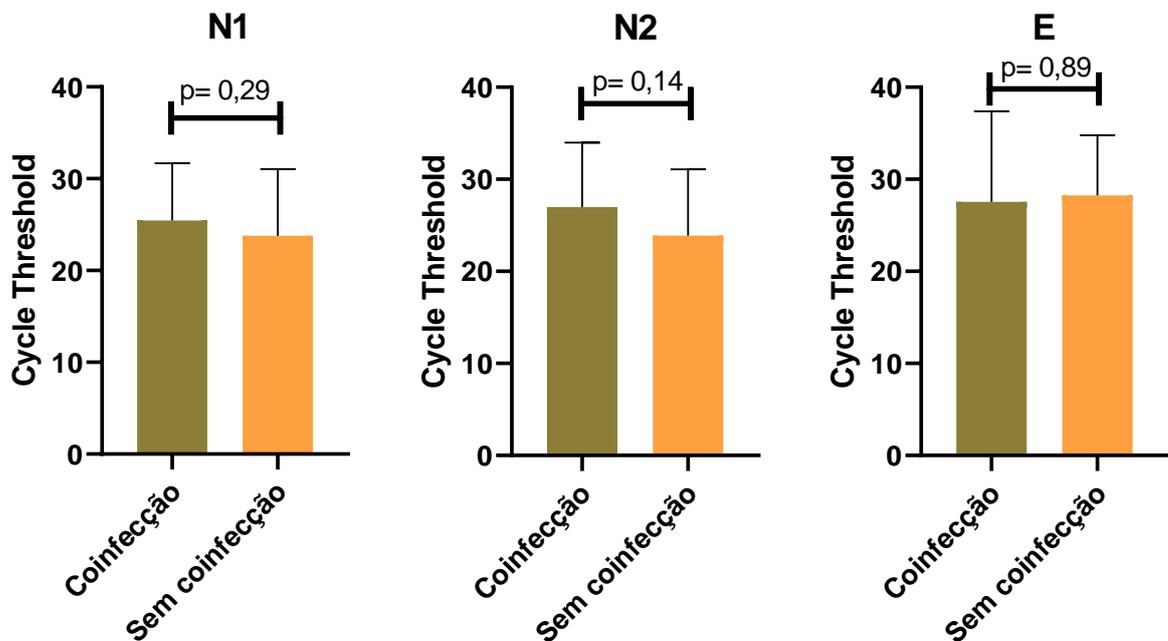
Herpesvírus	Complicações		P-valor
	Sem SARS n= 25	SARS n= 35	
EBV	7 (28,0)	8 (22,8)	0,65
CMV	1 (4,0)	4 (11,4)	0,30
HHV-6	6 (24,0)	7 (20,0)	0,71
EBV e CMV	0	1 (2,8)	0,39
CMV e HHV-6	0	1(2,8)	0,39
EBV e HHV-6	2 (8,0)	3 (8,5)	0,93
	Sem SEPSE n= 33	SEPSE n= 27	
EBV	9 (27,1)	6 (22,2)	0,65
CMV	3 (9,0)	2 (7,4)	0,81
HHV-6	5 (15,1)	8 (29,6)	0,17
CMV e HHV-6	0	1 (3,7)	0,26
EBV e HHV-6	3 (9,0)	2 (7,4)	0,81
	Sem IRA n= 33	IRA n= 27	
EBV	8 (24,2)	7 (25,9)	0,88
CMV	2 (6,0)	3 (11,1)	0,48
HHV-6	4 (12,1)	9 (33,3)	0,04*
EBV e CMV	0	1 (3,7)	0,26
CMV e HHV-6	0	1 (3,7)	0,26
EBV e HHV-6	1 (3,0)	4 (14,8)	0,10
	Sem UTI/Intubação n= 17	UTI/Intubação n= 43	
HSV-1	0	1 (2,3)	0,52
EBV	6 (35,3)	9 (20,9)	0,43
CMV	1 (5,8)	4 (9,3)	0,66
HHV-6	4 (25,2)	9 (20,9)	0,82
EBV e CMV	0	1 (2,3)	0,52
CMV e HHV-6	0	1 (2,3)	0,52
EBV e HHV-6	2 (11,7)	3 (6,9)	0,19

Dados são apresentados por n (%). P-valor calculado pelo teste qui-quadrado (*). SARS = síndrome respiratória aguda; IRA = insuficiência renal aguda, UTI Unidade de Terapia Intensiva.

6.3 ANÁLISES DO *CYCLE THRESHOLD* DOS PACIENTES SARS-COV-2 DE ACORDO COM COINFECCÃO

Ao realizarmos o RT-qPCR de SARS-COV-2 obtivemos limiar de detecção, também chamado CT (do inglês *Cycle Thershold*). Na figura 4 está representada a média e desvio padrão dos CT referentes aos alvos virais divididos nos grupos com e sem coinfeccção com Herpesvírus. No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos em relação aos alvos virais N1($p=0,29$), N2 ($0,19$), E ($p=0,89$).

Figura 4 - Comparação dos *Cycle Thershold* segundo o alvo viral SARS-CoV-2 entre os grupos



Cycle Thresholds (CT) dos alvos N1, N2 e E das amostras dos pacientes hospitalizados com COVID-19, foram analisados pelos testes de Mann-Whitney (genes N1, N2) e com o teste t (gene E) de acordo com a presença de coinfeccção.

6.4 ANÁLISES DO PERFIL BIOQUÍMICO E HEMATOLÓGICO DOS PACIENTES SARS-COV-2 HOSPITALIZADOS

Na análise do perfil laboratorial dos pacientes com COVID-19 dividimos em dois grupos de acordo com a presença ou não de coinfeccção. Os grupos foram analisados em três tempos T0 (admissão), T1 (7dias após admissão) e T2 (14 dias após admissão).

No momento da admissão, foram avaliados parâmetros como: proteína C reativa, ferritina, albumina, AST, ALT, GGT, creatinina, ureia, hemoglobina, leucócitos, linfócito, plaquetas, dímero D e parâmetros de coagulação como: tempo de protrombina (PT) e tempo de tromboplastina parcial (PTT) (tabela 8). Os valores de proteína C reativa teve média de $17,92 \pm 14,67$ mg/dL no grupo sem coinfeção, e média de $16,85 \pm 11,53$ mg/dL no grupo com coinfeção, porém sem diferenças estatísticas entre eles. O valor superior de normalidade para esse analito é até 0,5 mg/dL, desta maneira, independente do grupo estudado, observamos o aumento de proteína C reativa nos pacientes com SARS-COV-2.

Quando analisamos as concentrações de albumina entre os grupos, podemos observar que foram semelhantes, onde no grupo sem coinfeção foi observada uma concentração de $2,96 \pm 0,68$ g/dL e no grupo com presença de coinfeção foi de $2,98 \pm 0,62$ g/dL. A média das atividades das enzimas AST, ALT e GGT foram maiores no grupo sem coinfeção do que no grupo com coinfeção. Nos pacientes sem coinfeção viral as médias foram: AST $46,04 \pm 37,94$ U/L, ALT $31,82 \pm 28,67$ U/L e GGT $156,9 \pm 122,6$ U/L, enquanto nos pacientes com coinfeção as médias foram: AST $39,82 \pm 20,9$ U/L; ALT $29,86 \pm 23,67$ U/L; GGT $155,8 \pm 171,8$ U/L.

Em relação à creatinina sérica observamos um aumento das concentrações ao compararmos com o valor superior de referência (mulheres- 0,5 a 0,9 mg/dL; homens- 0,7 a 1,2 mg/dL). A média do grupo sem coinfeção foi de $1,67 \pm 1,50$ mg/dL enquanto no grupo com coinfeção foi de $1,72 \pm 1,89$ mg/dL, não havendo diferença estatística entre os grupos. Ao avaliarmos as concentrações de ureia verificou-se o aumento do analito nos pacientes se comparado com o valor superior de referência (16,6 a 48,5 mg/dL), o aumento foi maior no grupo sem a coinfeção $61,58 \pm 49,9$ mg/dL do que no grupo com a presença de coinfeção $53,37 \pm 45,46$ mg/dL.

Os valores de ferritina obtidos foram 1963 ± 2148 ng/mL, com concentrações elevadas em relação ao valor superior de referência (mulheres - 15,0 a 150,0 ng/mL; homens - 30,0 a 400,0 ng/mL). Essa elevação das concentrações de ferritina foi maior no grupo com coinfeção tendo média de 2678 ± 2757 ng/mL do que no grupo sem coinfeção (1282 ± 1005 ng/mL), com diferença estatística entre os grupos de $p=0,03$. Observamos que as concentrações séricas do dímero D foi de 2610 ± 2331 ng/mL na população do estudo, demonstrando a conhecida elevação das concentrações nesses pacientes com COVID-19, e quando estratificamos nos grupos de estudo, nenhuma diferença estatística foi observada.

Em relação aos parâmetros hematológicos avaliamos as concentrações de hemoglobina, a contagem de plaquetas, leucócitos e linfócitos no sangue dos pacientes com

COVID-19. As concentrações de hemoglobina ficaram em média de $10,54 \pm 2,59$ g/dL, sendo semelhante em ambos os grupos. A leucopenia estava presente em 14/60 (23,3%) dos pacientes, 9 (33,3%) do grupo de coinfeção e 5 (15,2%) do grupo sem coinfeção. Os pacientes apresentaram também linfopenia em 38/60 (63,3%), sendo 17 no grupo com coinfeção e 21 nos grupos sem coinfeção.

Tabela 4 - Análise dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no momento da admissão de acordo com a coinfeção de Herpesvírus em pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro

Parâmetros (média \pm DP)	Todos n = 60	Sem coinfeção n = 33	Coinfeção n = 27	P-value
Proteína C reativa (mg/dL)	17,44 \pm 13,25	17,92 \pm 14,67	16,85 \pm 11,53	0,76
Ferritina (ng/mL)	1963 \pm 2148	1282 \pm 1005	2678 \pm 2757	0,03*
Albumina (g/dL)	2,97 \pm 0,62	2,96 \pm 0,68	2,98 \pm 0,62	0,93
AST (U/L)	43,41 \pm 30,86	46,04 \pm 37,94	39,82 \pm 20,9	0,97
ALT (U/L)	30,79 \pm 26,31	31,82 \pm 28,67	29,86 \pm 23,67	0,62
GGT (U/L)	158,9 \pm 151,4	156,9 \pm 122,6	155,8 \pm 171,8	0,84
Creatinina (mg/dL)	1,69 \pm 1,67	1,67 \pm 1,50	1,72 \pm 1,89	0,75
Uréia (mg/dL)	57,88 \pm 47,78	61,58 \pm 49,9	53,37 \pm 45,46	0,35
Hemoglobina (g/dL)	10,54 \pm 2,59	10,55 \pm 2,65	10,53 \pm 2,57	0,97
Plaquetas $10^3/\text{mm}^3$	244,7 \pm 127,2	258,9 \pm 131,2	227,9 \pm 122,5	0,35
Leucopenia - n (%) Sim	14 (23,3)	5 (15,2)	9 (33,3)	0,09
Linfopenia - n (%) Sim	38 (63,3)	21 (63,6)	17 (62,9)	0,83
PT (s)	14,86 \pm 2,41	14,87 \pm 2,64	14,85 \pm 2,19	0,98
PTT (s)	37,51 \pm 7,39	38,39 \pm 7,62	36,51 \pm 7,16	0,40
Dímero - D (ng/mL)	2610 \pm 2331	2688 \pm 2614	2522 \pm 2017	0,99

Dados são apresentados por média e desvio padrão (DP). P-valor calculado pelo teste T*, Mann-Whitney e teste qui-quadrado. AST= Transaminase oxalacética; ALT= Transaminase pirúvica; GGT= Gama glutamil transpeptidase; Leucopenia < 4000 $10^3/\text{mm}^3$; linfopenia < 1000 $10^3/\text{mm}^3$; PT= Tempo de Protrombina; PTT= Tempo de Tromboplastina Parcial.

Na análise dos parâmetros laboratoriais com 7 dias da admissão hospitalar entre os grupos com e sem coinfeção pelo Herpesvírus (tabela 9) somente observamos diferença

significativa entre os grupos no parâmetro laboratorial da ferritina ($p=0,01$). Ao contrário da avaliação na admissão, a média das atividades enzimáticas das aminotransferase (AST e ALT) e GGT foram maiores no grupo com coinfeção do no grupo sem coinfeção.

Quanto aos parâmetros hematológicos, as concentrações de hemoglobina ficaram em média de $9,60 \pm 2,64$ g/dL, sendo semelhante nos dois grupos. A leucopenia estava presente em 17/60 (28,3%) dos pacientes, 7 (25,9%) do grupo de coinfeção e 10 (30,3%) do grupo sem coinfeção. A linfopenia esteve presente nos pacientes estudados em 23/60 (38,3%), sendo 12 no grupo com coinfeção e 11 no grupo sem coinfeção.

Tabela 5- Análise dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no período de 7 dias após admissão de acordo com a coinfeção de Herpesvírus em pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro

Parâmetros (média \pm DP)	Todos n = 60	Sem coinfeção n = 33	Coinfeção n = 27	P-value
Proteína C reativa (mg/dL)	15,70 \pm 15,77	16,75 \pm 16,09	14,47 \pm 15,64	0,47
Ferritina (ng/mL)	1954 \pm 2029	987,7 \pm 719,1	2597 \pm 2370	0,02
Albumina (g/dL)	2,95 \pm 0,57	2,90 \pm 0,44	2,86 \pm 0,66	0,85
AST (U/L)	51,28 \pm 33,05	38,54 \pm 14,85	55,50 \pm 32,50	0,09
ALT (U/L)	68,83 \pm 163,6	39,07 \pm 30,0	96,6 \pm 225,8	0,75
GGT (U/L)	203,8 \pm 189,7	178,4 \pm 160,8	222,8 \pm 213,7	0,76
Creatinina (mg/dL)	2,19 \pm 2,06	1,99 \pm 1,89	2,42 \pm 2,25	0,35
Uréia (mg/dL)	89,82 \pm 72,08	95,27 \pm 83,17	83,92 \pm 59,0	0,85
Hemoglobina (g/dL)	9,60 \pm 2,64	9,65 \pm 2,89	9,54 \pm 2,39	0,89
Plaquetas $10^3/mm^3$	265,6 \pm 154,9	280,8 \pm 172,6	248,4 \pm 133,8	0,47
Leucopenia - n (%) Sim	17 (28,3)	10 (30,3)	7 (25,9)	0,70
Linfopenia - n (%) Sim	23 (38,3)	11(33,3)	12(44,4)	0,37
PT (s)	15,77 \pm 2,75	15,67 \pm 2,86	15,93 \pm 2,67	0,79
PTT (s)	41,97 \pm 17,34	43,01 \pm 20,24	40,30 \pm 11,75	0,98
Dímero – D (ng/mL)	4039 \pm 3346	5130 \pm 4206	3058 \pm 1959	0,28

Dados são apresentados por média e desvio padrão (DP). P-valor calculado pelo teste T*, Mann-Whitney e teste qui-quadrado. AST= Transaminase oxalacética; ALT= Transaminase pirúvica; GGT= Gama glutamil transpeptidase; Leucopenia < 4000 $10^3/mm^3$; linfopenia < 1000 $10^3/mm^3$; PT= Tempo de Protrombina; PTT= Tempo de Tromboplastina Parcial.

Aos 14 dias após a admissão, em relação aos dados laboratoriais, não foram observadas diferenças significativas dos parâmetros entre os grupos analisados (tabela 10). A média das concentrações de proteína C reativa, ferritina, Creatinina, Ureia e das atividades enzimáticas das transaminases (AST, ALT) foram maiores no grupo que teve coinfeção com $14,92 \pm 13,34$ mg/dL, $1726 \pm 844,7$ ng/mL, $2,50 \pm 2,05$ mg/dL, $135,4 \pm 131,3$ mg/dL, $53,55 \pm 43,49$ U/L; e $42,27 \pm 48,45$ U/L, respectivamente.

Tabela 6 - Análise dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no período de 14 dias após admissão de acordo com a coinfeção de Herpesvírus em pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro

Parâmetros (média ± DP)	Todos n = 60	Sem coinfeção n = 33	Coinfeção n = 27	P-value
Proteína C reativa (mg/dL)	13,87 ± 14,22	12,98 ± 15,24	14,92 ± 13,34	0,30
Ferritina (ng/mL)	1643 ± 1520	1579 ± 1946	1726 ± 844,7	0,17
Albumina (g/dL)	2,94 ± 1,02	2,98 ± 1,13	2,91 ± 0,95	0,87
AST (U/L)	46,28 ± 39,37	40,57 ± 36,42	53,55 ± 43,49	0,38
ALT (U/L)	40,60 ± 34,44	39,29 ± 19,48	42,27 ± 48,45	0,41
GGT (U/L)	205 ± 130,9	225,9 ± 147,3	180,3 ± 110,3	0,45
Creatinina (mg/dL)	2,15 ± 1,91	1,85 ± 1,77	2,50 ± 2,05	0,17
Uréia (mg/dL)	122,1 ± 110,5	110,2 ± 90,2	135,4 ± 131,3	0,63
Hemoglobina (g/dL)	9,28 ± 2,2	9,85 ± 2,32	8,59 ± 1,90	0,09
Plaquetas $10^3/\text{mm}^3$	265,6 ± 154,9	352,2 ± 186,3	262,6 ± 115,2	0,10
Leucopenia - n (%) Sim	9 (15)	7 (21,2)	2 (7,4)	0,13
Linfopenia - n (%) Sim	12 (20,0)	5 (15,1)	7(25,9)	0,29
PT (s)	14,80 ± 1,89	14,48 ± 1,66	15,17 ± 2,13	0,37
PTT (s)	36,56 ± 8,20	34,54 ± 6,60	38,97 ± 9,43	0,31
Dímero – D (ng/mL)	3578 ± 3476	3447 ± 3526	3720 ± 3717	0,65

Dados são apresentados por média e desvio padrão (DP). P-valor calculado pelo teste T*, Mann-Whitney e teste qui-quadrado. AST= Transaminase oxalacética; ALT= Transaminase pirúvica; GGT= Gama glutamil transpeptidase; Leucopenia < 4000 $10^3/\text{mm}^3$; linfopenia < 1000 $10^3/\text{mm}^3$; PT= Tempo de Protrombina; PTT= Tempo de Tromboplastina Parcial.

Em relação aos parâmetros hematológicos, as concentrações de hemoglobina foram em média de $9,28 \pm 2,2$ g/dL, com a média maior no grupo sem coinfeção $9,85 \pm 2,32$ g/dL. A leucopenia estava presente em 9/60 (15%) dos pacientes, sete (21,2%) do grupo de coinfeção e dois (7,4%) do grupo sem coinfeção. Apresentaram linfopenia 12/60 (20%) pacientes, sendo cinco (15,1%) do grupo com coinfeção e sete (25,9%) do grupo sem coinfeção. Além disso, o tempo de PT ($15,17 \pm 2,13$), PTT ($38,97 \pm 9,43$) e a concentração de dímero D (3720 ± 3717) foram maiores no grupo com a presença da coinfeção

6.4 ANÁLISE LONGITUDINAL DOS DADOS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS DOS GRUPOS NO ESTUDO

Os grupos foram analisados em três tempos T0 (admissão), T1 (7dias após admissão) e T2 (14 dias após admissão) (tabelas 7 e 8). No grupo com coinfeção ocorreu aumento sérico de ferritina ($p=0,005$), albumina ($p=0,36$), creatinina ($p=0,30$), ureia ($p= 0,01$) e dímero D ($p=0,09$). Enquanto as aminotransferase, o PT e o PTT tiveram aumento no T1 e diminuição em T2, já a quantidades de plaquetas reduziu em T1 e aumentou no T2. A presença de leucopenia e linfopenia foi menos frequente ao longo dos tempos analisados, assim como a concentração de hemoglobina ($p=0,007$) e da proteína C reativa ($p=0,53$).

No grupo de ausência de coinfeção observamos o aumento das concentrações e atividade enzimática de albumina ($p=0,36$), GGT ($p=0,008$), uréia ($p=0,005$) e na contagem de plaquetas ($p=0,006$). Ao longo dos tempos analisados houve redução nas concentrações de proteína C reativa ($p=0,16$), de hemoglobina (0,05) e na frequência de leucopenia (0,23). Além disso, as atividades séricas de AST, ALT e a concentração do dímero D aumentaram significativamente no T1 e diminuíram em T2. A concentração da ferritina em T1 diminuiu e em T2 houve um aumento, o mesmo ocorreu com a frequência de linfopenia, que apresentou uma diminuição em T1 e aumento em T2.

Tabela 7 - Análise longitudinal dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no grupo com coinfeção de Herpesvírus nos pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro

Parâmetros (média ± DP)	T0	T1	T2	P-value
Proteína C reativa (mg/dL)	16,71±11,66	13,23±10,81	14,69±13,47	0,53
Ferritina (ng/mL)	3843±2625	11541±22549	1836±869,3	0,05
Albumina (g/dL)	2,71±0,48	2,75±0,75	3,02±1,00	0,36
AST (U/L)	34,0±13,93	52,0±33,23	32,83±11,55	0,10
ALT (U/L)	20,86±10,07	47,86±35,62	31,14±19,75	0,06
GGT (U/L)	134,5±187,8	360,5±342,8	233,5±171,6	0,43
Creatinina (mg/dL)	1,52±1,53	2,55±2,56	2,50±2,05	0,30
Uréia (mg/dL)	40,29± 37,28	88,71±71,20	115,8 ± 89,79	0,01^a
Hemoglobina (g/dL)	10,45 ± 2,67	9,14 ± 2,30	8,59 ± 1,90	0,007^b
Plaquetas 10 ³ /mm ³	238,9 ± 117,5	232,1 ± 114,6	262,6 ± 115,2	0,64
Leucopenia - n (%) Sim	9 (33,3)	7 (25,9)	2 (7,4)	0,06
Linfopenia - n (%) Sim	17 (62,9)	12 (44,4)	5 (18,5)	0,004
PT (s)	14,95 ± 2,69	15,64 ± 2,60	15,15 ± 2,32	0,75
PTT (s)	35,80 ± 7,38	38,91 ± 10,99	37,75 ± 8,46	0,47
Dímero – D (ng/mL)	1889 ± 1372	3484 ± 2077	3899 ± 3823	0,09

Dados são apresentados por média e desvio padrão (DP). P-valor calculado pelo teste ANOVA, Friedman e teste qui-quadrado. AST= Transaminase oxalacética; ALT= Transaminase pirúvica; GGT= Gama glutamil transpeptidase; Leucopenia < 4000 10³/mm³; linfopenia < 1000 10³/mm³; PT= Tempo de Protrombina; PTT= Tempo de Tromboplastina Parcial. Análise com p significativo a = T0 vs T1, b = T0 vs T2 e a = T1 vs T2.

Tabela 8 - Análise longitudinal dos dados laboratoriais bioquímicos e hematológicos no grupo com ausência de coinfeção de Herpesvírus nos pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro

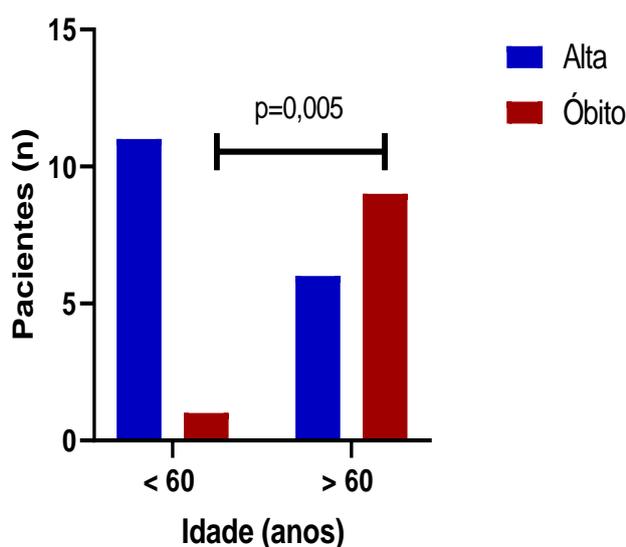
	T0	T1	T2	P-value
Proteína C reativa (mg/dL)	18,62 ± 10,03	13,36 ± 12,71	14,26 ± 15,63	0,16
Ferritina (ng/mL)	1279 ± 1078	1063 ± 889,3	18757 ± 2381	0,44
Albumina (g/dL)	2,71 ± 0,48	2,75 ± 0,75	3,02 ± 1,00	0,36
AST (U/L)	30,43 ± 29,39	30,86 ± 15,76	58,14 ± 44,40	0,02^b
ALT (U/L)	20,29 ± 14,08	21,43 ± 9,71	36,14 ± 10,79	0,02
GGT (U/L)	69,4 ± 71,96	149,2 ± 162,6	228,4 ± 184,4	0,008^b
Creatinina (mg/dL)	1,12 ± 0,96	1,15 ± 1,13	1,90 ± 1,81	0,09
Uréia (mg/dL)	41,31 ± 29,63	64,81 ± 46,45	120 ± 91,20	0,005^b
Hemoglobina (g/dL)	10,61 ± 3,09	9,62 ± 2,77	9,85 ± 2,32	0,05^a
Plaquetas 10 ³ /mm ³	264,6 ± 151,60	320,3 ± 183,60	352,20 ± 186,3	0,006^b
Leucopenia - n (%) Sim	5(15,1)	3(9,0)	1 (3,0)	0,23
Linfopenia - n (%) Sim	21(63,6)	10(30,0)	16 (48,4)	0,02
PT (s)	13,73 ± 1,43	14,72 ± 2,045	14,51 ± 1,713	0,06
PTT (s)	35,33 ± 6,609	37,51 ± 10,08	35,03 ± 6,518	0,48
Dímero – D (ng/mL)	3608 ± 3913	5439 ± 4746	4217 ± 3806	0,53

Dados são apresentados por média e desvio padrão (DP). P-valor calculado pelo teste ANOVA, Friedman e teste qui-quadrado. AST= Transaminase oxalacética; ALT= Transaminase pirúvica; GGT= Gama glutamil transpeptidase; Leucopenia < 4000 10³/mm³; linfopenia < 1000 10³/mm³; PT= Tempo de Protrombina; PTT= Tempo de Tromboplastina Parcial. Análise com p significativo a = T0 vs T1, b = T0 vs T2 e a = T1 vs T2.

6.6 DISTRIBUIÇÃO DAS COINFECÇÕES POR HERPESVÍRUS DE ACORDO COM DESFECHO CLÍNICO

No grupo de faixa etária menor que 60 anos observamos 12 (20%) casos SARS-CoV-2/Herpesvírus, dentre eles 11 (91,7%) pacientes tiveram alta e foi observado apenas um (8,3%) óbito. Porém, no grupo com a faixa etária maior que 60 anos observamos 15 (25%) casos de coinfeção SARS-CoV-2 e Herpesvírus. dentre eles, seis (40%) tiveram alta e nove (60%) foram ao óbito. Ao analisarmos a frequência de óbitos entre os grupos, o número de óbitos foi maior no grupo maior de 60 anos ($p=0,005$) (Fig.5).

Figura 5 - Comparação do desfecho de acordo com a idade no grupo SARS-CoV-2/Herpesvírus



Desfechos dos pacientes hospitalizados com SARS-CoV-2 e Herpesvírus, analisamos de acordo com duas faixas etárias de idade, o pelo teste de qui-quadrado.

Do total dos 60 pacientes internados pela COVID-19, tiveram alta hospitalar 32 pacientes e foram ao óbito 28 pacientes (tabela 9). Entre os pacientes que foram ao óbito 12 (42,8%) apresentaram coinfeção por Herpesvírus: seis (21,4%) SARS-CoV-2/EBV, quatro (14,2%) SARS-CoV-2 /HHV-6, dois (7,2%) SARS-CoV-2/CMV, um (3,5%) SARS-CoV-2 /EBV e HHV-6, e um (3,5%) SARS-CoV-2/ EBV e CMV. Na análise da distribuição de coinfeções pelo Herpesvírus de acordo com desfecho não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 9 - Coinfecções por Herpesvírus de acordo com o desfecho de pacientes hospitalizados com COVID-19 no Hospital Universitário Antônio Pedro

Coinfecções	Todos n = 60	Alta n = 32	Óbito n = 28	<i>P</i>-valor
SARS-CoV-2/EBV	15 (25,0)	9 (28,1)	6 (21,4)	0,55
SARS-CoV-2 /HHV-6	13 (21,6)	9 (28,1)	4 (14,2)	0,17
SARS-CoV-2/CMV	5 (8,0)	3 (9,3)	2 (7,2)	0,75
SARS-CoV-2 /VZV	2 (3,3)	2 (6,2)	0	0,17
SARS-CoV-2 /EBV e HHV-6	5 (8,3)	4 (12,5)	1 (3,5)	0,21
SARS-CoV- 2/ EBV e CMV	1(1,6)	0	1 (3,5)	0,28
SARS-CoV- 2/ EBV e VZV	2 (3,3)	2 (6,3)	0	0,17
SARS-CoV-2/CMV e HHV-6	1 (1,6)	1 (3,1)	0	0,34

Dados são apresentados por n (%). *P*-valor calculado pelo teste qui-quadrado.

7 DISCUSSÃO

A SARS-CoV-2 é uma infecção viral que em alguns casos pode levar a uma grave lesão pulmonar, que culmina no óbito. Este estudo teve como objetivo investigar a frequência dos Herpesvírus em pacientes com COVID-19 internados no HUAP. Nós observamos que há um número grande de pacientes coinfectados pelos Herpesvírus (45%) e que a mortalidade é mais frequente em pacientes coinfectados maiores de 60 anos de idade.

Já é sabido que a frequência de pacientes internados com COVID-19 apresenta média de idade entre 57-80 anos, com predomínio do sexo masculino e comorbidades como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, câncer e doença renais. (ARGENZIANO et al., 2020; CHEN et al., 2020) As doenças cardiovasculares, diabetes, doenças pulmonares são as principais comorbidade do grupo de risco com pior prognóstico. (NOWROOZI et al., 2021; ZHANG et al., 2020) Ainda, os pacientes com COVID-19 que apresentam sintomas respiratórios hipoxêmicos podem evoluir rapidamente para a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e linfo-histiocitose hemofagocítica secundária, progredindo para a síndrome de disfunção do sistema de múltiplos órgãos.(CHEN et al., 2020a; MEHTA et al., 2020) As complicações mais observadas na COVID-19 estão a pneumonia com evolução para a síndrome respiratória aguda, insuficiência renal, sepse, coagulopatias, a tempestade de citocinas, manifestações cutâneas e neurológicas.(GALVÁN-CASAS et al., 2020; GUAN et al.,

2020; HUANG et al., 2020) Nosso estudo mostrou que a população dos pacientes hospitalizados no Hospital Universitário Antônio Pedro também possuiu média de idade de 60.1 anos e predomínio do sexo masculino. Já as comorbidades mais frequentes foram doença cardiovascular, câncer, diabetes. Nossos dados estão de acordo com a literatura mundial (CHEN et al., 2020a; WANG et al., 2020), porém vale mencionar que nosso hospital tem predominantemente um atendimento de alto risco, sendo classificado como hospital quaternário dentro do sistema de saúde.

O diagnóstico viral através do RT-qPCR de SARS-CoV-2 foi realizado em média 6 dias após o início dos sintomas. A infecção pelo SARS-CoV-2 se apresenta inicialmente como uma gripe e de fato, os pacientes somente chegam ao hospital ao fim da 1 a semana, quando os sintomas tendem a se agravar. Os sintomas mais frequentes foram febre (60%), tosse (50%), dispneia (45%) e saturação de O₂ < 95 % em 25 pacientes (41,6%). Esses achados estão de acordo com estudos epidemiológicos realizados na China que descreve os sintomas

febre, tosse, fadiga, anorexia, mialgia e diarreia em todos os pacientes COVID-19. Porém, quando tinham dispneia, distúrbios de consciência, taquicardia e / ou taquipneia, e a saturação de oxigênio menor que 93%, indicava estado grave ou crítico na admissão. (HUNG et al., 2019; ZHANG et al., 2020) A identificação do início de certos sintomas pode ajudar os médicos a mensurar o risco de um desfecho desfavorável. (CHEN et al., 2020b)

A síndrome do desconforto respiratório agudo foi identificada em 40% a 96% dos pacientes internados na UTI. (GUAN et al., 2020; ZHANG et al., 2020) No entanto a necessidade de ventilação mecânica invasiva (VMI) variou entre os diferentes estudos realizados, mas ambos os parâmetros clínicos foram associados a alta mortalidade. (CHEN et al., 2020b; HUANG et al., 2020; WANG et al., 2020) Cerca de 60% dos pacientes envolvidos na pesquisa foram internados na UTI, tendo a necessidade de suporte respiratório invasivo (intubação) em 56,7% dos casos. Vale mencionar que a gravidade pode estar associada com infecções secundárias relacionadas com o tubo, condição que também favorece elevadas taxas de mortalidade. Alterações na contagem de neutrófilos, concentração de hemoglobina, contagem de plaquetas, na atividade das aminotransferases, dímero D, PT, PTT, proteína C reativa, uréia no sangue e concentrações de creatinina e ferritina encontram-se elevados e as contagens de linfócitos diminuindo juntamente com a presença de coinfeções ao longo do tempo de internação. Estas alterações concomitantes podem ser preditores de gravidade por COVID-9. (GUAN et al., 2020; LIN et al., 2020; WANG et al., 2020) Nos pacientes do estudo observamos alterações na concentração de: dímero D, uréia, creatinina, albumina, hemoglobina, atividade das aminotransferase, no prolongamento nos tempos de PT, PTT e na contagem de leucócitos durante período de acompanhamento que foi até o 14º dia após a admissão. Essas alterações laboratoriais são semelhantes às relatadas anteriormente nos estudos clínicos-laboratoriais. (GUAN et al., 2020; HUANG et al., 2020; WANG et al., 2020) Contudo observamos que na nossa população não houve trombocitopenia e leucocitose estando contrário ao relatado em alguns estudos da literatura. (GUAN et al., 2020; ZHANG et al., 2020)

O SARS-CoV-2 pode iniciar uma hiperestimulação do sistema imunológico, com ativação excessiva de macrófagos locais. Estes produzem alto nível de mediadores inflamatórios, como: citocinas, quimiocinas e ferritina. (KIM et al., 2021) Com a superprodução de citocinas pelos macrófagos aumenta o processo inflamatório e desencadeia a hiperferritinemia no sangue periférico. (ROSÁRIO et al., 2013; VLAHAKOS et al., 2021) A infecção por SARS-CoV-2 afeta linfócitos T, particularmente células T CD4, células T CD8 e células natural killer, resultando em exaustão funcional e diminuição do número celular (Zheng, Gao et al. 2020).

A ferritina é um biomarcador de inflamação de fase aguda, em condições inflamatórias, autoimunes, infecciosas ou malignas. (ROSÁRIO et al., 2013) Nos pacientes COVID-19 apresenta-se como marcador de gravidade, como já visto em outras doenças inflamatórias e infecções virais como dengue, influenza e dos Herpesvírus. (CHENG et al., 2020; VLAHAKOS et al., 2021) Os pacientes do estudo apresentaram hiperferritinemia, porém o grupo com coinfeção pelo Herpesvírus apresentou concentrações de ferritina maiores nos três tempos de análise e também foi maior ao comparar com o grupo sem infecção por Herpesvírus. As alterações laboratoriais podem estar associadas à deficiência imunológica celular, ativação da coagulação, lesão do miocárdio, lesão hepática e lesão renal podendo levar a alta taxa de mortalidade. (CHEN et al., 2020a; GUAN et al., 2020) Evidências mostram que durante o agravamento da COVID-19 há o aumento das concentrações de ferritina, dímero-D, lactato desidrogenase e IL-6, apontando o risco de mortalidade. (TURAL ONUR et al., 2021)

Ao analisarmos os valores de CT dos alvos N1 e N2 foi demonstrado que quanto menor o valor de CT maior o risco de mortalidade, podendo ser considerado um preditor de mortalidade. (Artigo em submissão). Porém, ao dividirmos os grupos com coinfeção ou sem coinfeção não foram observadas diferenças nos valores de CT, independente do alvo viral. Como já sabido, os valores de CT são inversamente proporcionais à carga viral. Na revisão sistemática de RAO et al., (2020) onze estudos mostraram a correlação dos valores de CT e a gravidade dos sintomas na admissão e em sete deles sugeriam que valores mais baixos de CT estavam associados a doenças mais graves. Em outros estudos verificou-se correlação com dados da tomografia computadorizada, com dados laboratoriais como LDH, necessidade de UTI e intubação. (KARAHASAN YAGCI et al., 2020; MAGLEBY et al., 2020; RAJYALAKSHMI et al., 2021)

Os pacientes hospitalizados pela COVID-19 tendem a desenvolverem infecções secundárias por vírus, bactérias e fungos variando de 0,6% a 45% em alguns estudos. (HUANG et al., 2020) Cerca de 50% dos pacientes não sobreviventes tiveram coinfeções durante o tempo de internação. (LAI; WANG; HSUEH, 2020) Além disso, existe a necessidade de pesquisas microbiológicas abrangentes e avaliações clínicas nos pacientes hospitalizados por COVID-19, principalmente no setor de unidade de terapia intensiva (UTI) para elucidar os fatores de risco para o aumento da mortalidade. (GARCIA-VIDAL et al., 2021; ZHU et al., 2020)

Nós observamos que 41,9 % dos casos de coinfeção SARS-CoV-2/ Herpesvírus foram para a Unidade de Terapia Intensiva (UTI) com menos de 30 dias de internação. Sendo

assim nossos dados são concordantes aos do estudo de WALTON et al., (2014) que mostram a presença de viremia por Herpesvírus variando de 10% a 53% nos primeiros 30 dias de internação na UTI. Além disso, os pacientes internados na UTI com complicações, como sepse e síndrome do desconforto respiratório agudo (SARS), possuem o risco de reativação do Herpesvírus. Também a reativação de mais de um Herpesvírus pode estar associada ao aumento da mortalidade na UTI. (MALLET et al.,2019; ONG et al., 2017) Em nossos pacientes imunossuprimidos e com SARS-CoV-2 apresentaram pelo menos um Herpesvírus concomitante. Da mesma forma, o estado imunossupressor resultante pode estimular a reativação da infecção viral latente, resultando em uma piora repentina dos sintomas no curso da recuperação (Xu, Zhou et al. 2020)

Os dados dos pacientes internados apresentados no presente estudo, não correspondem a população saudáveis no geral. As características de nossa população hospitalizada são os pacientes com idade avançada, possuindo comorbidades como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e imunossuprimidos (doenças autoimunes, transplantados). Estudos com pacientes sob imunossupressão mostram que a infecção por Herpesvírus estimula reações inflamatórias no trato gastrointestinal, nos pulmões e no sistema nervoso central. (LEE et al., 2016; XIAO et al., 2006) Além disso, em pacientes com doenças hematológicas crônicas os Herpesvírus podem desempenhar um papel importante com a progressão de hemoglobinopatias, linfomas, mielomas, hemofilia, anemia falciforme, aplásica e lesões mucocutâneas. (PIUKOVICS et al., 2017)

A infecção ativa e a reativação pelos Herpesvírus desencadeiam uma resposta inflamatória exacerbada, com o aumento de secreção de mediadores pró-inflamatórios (IL-6, IL-10, TNF-alfa, IFN-gama) (FUJITA et al., 2008; JAKOVLJEVIC et al., 2018) e em alguns casos de HCMV e EBV leva ao desenvolvimento da síndrome hemofagocítica. (SONKE et al., 2008)

O presente estudo apresentou alta frequência de coinfeção SARS-CoV-2 e Herpesvírus numa população com o número amostral pequeno, ao contrário do relatado num estudo realizado na França com 38 pacientes, nove tiveram reativação de HSV, dois apresentaram reativação de CMV e sete tiveram co-reativação de HSV e CMV. (LE BALC'H et al., 2020) Outros relatos de casos de coinfeção/reativação de Herpesvírus como HSV 1 e VZV, foram observados nos pacientes COVID-19 positivos na Itália e Egito, influenciando no tempo de internação e prognóstico dos pacientes. (NOFAL et al.,2020; TARTARI et al., 2020)

No entanto quando observamos a distribuição de coinfeções associada com o desenvolvimento das principais complicações (SARS, Sepsis, IRA e CTI/Intubação), em maioria não houve diferenças estatísticas, exceto na coinfeção SARS-CoV-2 e HHV-6 que neste caso foi evidenciado o desenvolvimento da insuficiência renal aguda. Os pacientes internados na UTI com intubação tiveram a frequência de coinfeção por Herpesvírus maior que os pacientes que não foram para a UTI. Segundo Le Balc'h et al. (2020), as reativações pelo Herpesvírus podem ser frequentes nos pacientes com síndrome respiratória aguda por COVID-19, tendo taxas mais elevadas nos pacientes gravemente enfermos.

A população humana em todo mundo geralmente adquire alguns Herpesvírus durante a infância ou durante o início da vida, podendo haver algumas diferenças regionais. (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007). A soroprevalência dos Herpesvírus na população mundial varia de 60-90%. As maiores taxas de soroprevalência para HSV-1, HSV-2, CMV e EBV encontra-se nos países em desenvolvimento. (FISHMAN, 2013) A primo-infecção dos HHV em indivíduos imunocompetentes é frequentemente assintomática ou minimamente sintomática, porém em pessoas imunocomprometidas infectadas principalmente por CMV, HSV ou VZV as taxas de morbidade e mortalidade podem ser altas. (FISHMAN, 2013)

O espectro das manifestações clínicas das infecções por Herpesvírus variam desde uma doença leve ou subclínica até sintomáticas, apresentando quadros de encefalite, pneumonia e quadro infeccioso potencialmente letais causando câncer, como: linfoma, sarcoma e carcinoma nasofaríngeo. (GIANELLA et al., 2015)

Os membros da família Herpesviridae compartilham algumas propriedades importantes como a replicação do ácido nucleico viral e a montagem do capsídeo acontecem no núcleo da célula hospedeira, enquanto o vírion é processado no citoplasma. A replicação lítica inibe a síntese de RNA e proteína do hospedeiro, e liberação viral resulta na lise da célula hospedeira. O sítio de replicação dos Alfa herpesvírus são as células mucoepiteliais, dos Beta herpesvírus são células endoteliais, epiteliais, musculares e fibroblastos (JANG et al., 2009) e Gama herpesvírus são em células linfoblastóides, com o ciclo lítico em alguns fibroblastos e células epiteliais. (FISHMAN, 2013) Após a infecção primária esses vírus permanecem nas pessoas ao longo da vida estabelecendo uma infecção latente (estágio de latência) em seus respectivos sítios alvos. (ONG et al., 2017) O sítio alvo de latência dos Alfa herpesvírus (HSV-1, HSV-2, VZV) são os nervos trigêmeo (COHRS; LAGUARDIA; GILDEN, 2005), dos Beta herpesvírus (HCMV, HHV-6, HHV-7) em células de origem mielóide, e os Gama herpesvírus (EBV, HHV-8) em células B. Ao longo da vida o marcador

de infecção latente é caracterizado pela presença de anticorpos contra o vírus, com o teste sorológico positivo. (FISHMAN, 2013)

A infecção lítica causa o aumento da produção de genomas virais, partículas virais e morte celular. Na latência ocorre produção de “transcrições associadas à latência” (LAT) e com a persistência do genoma viral dentro da célula com potencial para reativação em um momento posterior. (FLEMINGTON, 2001) A infecção primária ou infecção de reativação promovem manifestações clínicas que dependem das células infectadas e da adequação da resposta imune do hospedeiro ao vírus. (KENNEDY et al., 2015)

Há estudos em que a soropositividade de IgG para HSV-1, EBV e CMV está sendo associada ao risco aumentado do declínio em funções cognitivas se comparada com outras infecções virais. (DI BENEDETTO et al., 2019; KOBAYASHI et al., 2013; PANTER-BRICK et al., 2020; THOMAS et al., 2013) Em pacientes com HIV são detectados na mucosa intestinal os vírus CMV e EBV que podem levar à inflamação local e sistêmica. (GIANELLA et al., 2015) Ademais, a infecção por HCMV pode apresentar efeitos citopáticos, resultando em inclusões nucleares e citoplasmáticas que resultam nas alterações morfológicas com células infectadas com hipertrofia. (DAS; VASANJI; PELLETT, 2007) O CMV possui capacidade de escapar das respostas imunológicas do hospedeiro, podendo causar alterações na composição do sistema imunológico, sendo algumas dessas mudanças relacionadas com o envelhecimento. (NIKOLICH-ŽUGICH et al., 2020) A associação de infecção por CMV ou pneumonite por CMV e pancitopenia são fatores de risco para mortalidade intrahospitalar. (HUNG et al., 2019)

A infecção ativa do HCMV nos indivíduos imunocomprometidos pode levar a manifestações clínicas como: úlceras orais, periodontite, hiperplasia gengival, esofagite, hepatite, pancreatite, gastrite, apendicite. Já nos indivíduos imunocompetentes, os sintomas clínicos observados são faringite, linfadenopatia, febre e síndrome semelhante à mononucleose. (DE MATOS; MEYER; LIMA, 2011; FLEXMAN et al., 2001) No nosso estudo, essas manifestações clínicas causadas pela infecção não puderam ser mensuradas devidos a falta de relatos dessas manifestações nas fichas de avaliação clínica dos prontuários dos nossos pacientes.

Em relação ao desfecho dos pacientes COVID-19 coinfetados por Herpesvírus observou-se quantidade maior de coinfeção SARS-CoV-2 / EBV e SARS-CoV-2 /HHV-6 ambos apresentavam o mesmo número de pacientes com alta. Entretanto quando avaliamos mediante a idade com corte de 60 anos, podemos constatar que os pacientes que tinha idade mais avançada abrangiam número maior de coinfeção e de óbito quando comparado com os

pacientes com idade menor de 60 anos. O estudo de HILL et al. (2019) demonstraram que a detecção molecular de HHV-6 nos indivíduos imunocomprometidos com doença do trato respiratório inferior está associada com o risco aumentado de mortalidade.

Este estudo possui limitações com relação ao número de amostras (n) aos scores de gravidade utilizados no UTI, dados de tomografia de tórax, uso de medicamentos utilizados no tratamento e os dados de manifestações clínicas como desequilíbrios neurológicos, desequilíbrios gastrointestinais, síndrome hemofagocítica secundária e manifestações cutâneas, e dados sorológicos pertinentes aos Herpesvírus, não puderam serem evidenciadas devido à falta de dados nos prontuários. Essas limitações não puderam ser controladas, pois o estudo se realizou num período muito inicial da pandemia, que havia restrições de pessoas dentro do próprio hospital e se desconhecia os riscos para os alunos. O acesso ao prontuário foi realizado mais tardiamente e essa falta de dados muitas vezes não pode ser imediatamente solucionada. Em alguns casos graves, o paciente internou e 3 dias depois faleceu reduzindo muito nossa casuística. Também, acrescento que avaliar a presença de coinfeção em somente um ponto de coleta pode não ter sido a melhor metodologia, visto que pode haver infecções secundárias após 7 dias da admissão.

A detecção das coinfeções por Herpesvírus nos pacientes SARS-CoV-2 moderados a críticos é relevante. Sua verificação poderia ser utilizada como biomarcadores preditivos, elucidar a influência dessas infecções virais no prognóstico e auxiliar no manejo clínico desses pacientes. Até o presente momento há poucos estudos longitudinais mostrando alterações dos parâmetros laboratoriais com a presença de coinfeção Herpesvírus e COVID-19 numa população com quadro clínico moderado a crítico.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que:

- A coinfeção por Herpesvírus mostrou-se presente em 45% dos casos SARS-CoV-2 positivo em estado clínico moderado a crítico, sendo a coinfeção mais prevalente pelo EBV e HHV-6, principalmente nos casos de imunossupressão, podendo contribuir com agravamento do quadro clínico.
- Em geral os pacientes coinfectados por Herpesvírus apresentaram elevadas concentrações séricas de ferritina, na admissão e após sete dias, sugerindo que a coinfeção por Herpesvírus pode contribuir para um maior quadro inflamatório.
- A análise longitudinal dos pacientes coinfectados por Herpesvírus mostraram alterações nas concentrações de uréia, hemoglobina e na presença de linfopenia. Desta forma, a presença dos Herpesvírus poderia favorecer quadros de anemias, disfunções renais e respostas celulares ineficientes em pacientes internados com COVID-19.
- Os pacientes coinfectados por Herpesvírus e com idade superior a 60 anos apresentaram maior número de óbitos, provavelmente devido as comorbidades associadas e ao estado de imunossupressão.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLASHI, D. et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. **Archives of Virology**, v. 159, n. 5, p. 863–870, maio 2014.

AGUT, H.; BONNAFOUS, P.; GAUTHERET-DEJEAN, A. Update on infections with human herpesviruses 6A, 6B, and 7. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 47, n. 2, p. 83–91, mar. 2017.

ANDERSON, N. W.; BUCHAN, B. W.; LEDEBOER, N. A. Light Microscopy, Culture, Molecular, and Serologic Methods for Detection of Herpes Simplex Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 2–8, 1 jan. 2014.

ANKA, A. U. et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, n. 4, p. e12998, abr. 2021.

ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features*: HSV-1 literature review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 2, p. 107–121, 26 jul. 2007.

ARVIN, A. M. Varicella-zoster virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 3, p. 361–381, jul. 1996.

BAI, H. X. et al. Performance of radiologists in differentiating COVID-19 from viral pneumonia on chest CT. **Radiology**, p. 200823, 10 mar. 2020.

BENVENUTO, D. et al. **The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution**. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25688>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

BEREKAA, M. M. Insights into the COVID-19 pandemic: Origin, pathogenesis, diagnosis, and therapeutic interventions. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v. 13, p. 117–139, 1 jan. 2021.

BORDI, L. et al. Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. **Euro Surveillace: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 25, n. 8, fev. 2020.

CARBONE, A.; GLOGHINI, A.; DOTTI, G. EBV-Associated Lymphoproliferative Disorders: Classification and Treatment. **The Oncologist**, v. 13, n. 5, p. 577–585, maio 2008.

CAVALCANTE, J. R.; ABREU, A. DE J. L. DE. COVID-19 no município do Rio de Janeiro: análise espacial da ocorrência dos primeiros casos e óbitos confirmados. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, n. 3, jun. 2020.

CDC. **Labs**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>>. Acesso em: 29 jun. 2021.

CHAKRABORTY, C. et al. SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options. p. 11, [s.d.].

CHEN, X. et al. The microbial coinfection in COVID-19. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 18, p. 7777–7785, set. 2020.

CLARK, D. A. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7: Emerging pathogens in transplant patients. **International Journal of Hematology**, v. 76, n. S2, p. 246–252, mar. 2002.

CLARK, D. A.; GRIFFITHS, P. D. Human herpesvirus 6: relevance of infection in the immunocompromised host. **British Journal of Haematology**, v. 120, n. 3, p. 384–395, fev. 2003.

COHEN, J. I. Optimal treatment for chronic active Epstein-Barr virus disease. **Pediatric Transplantation**, v. 13, n. 4, p. 393–396, jun. 2009.

CORMAN, V. et al. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR. p. 13, 2020a.

CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, 23 jan. 2020b.

Coronavírus Brasil. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 17 maio. 2021.

CROUGH, T.; KHANNA, R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 76–98, jan. 2009.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, mar. 2019.

DAI, L.; GAO, G. F. Viral targets for vaccines against COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 2, p. 73–82, fev. 2021.

Data Rio: População Residente e Estimada - Brasil, Estado do Rio de Janeiro e Município do Rio de Janeiro e Regiões Administrativas (RA) - 2000/2010/2013-2016/2020. Disponível em:

<<https://www.data.rio/search?groupIds=0f4009068ec74e17b25eb3e70891b95f>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

DE CLERCQ, E.; NAESENS, L. In search of effective anti-HHV-6 agents. **Journal of Clinical Virology**, v. 37, p. S82–S86, dez. 2006.

DE GROOT, R. J. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of Virology**, v. 87, n. 14, p. 7790–7792, jul. 2013.

DEBAUGNIES, F. et al. Detection of Herpesviridae in Whole Blood by Multiplex PCR DNA-Based Microarray Analysis after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2552–2556, 1 jul. 2014.

DEVANTHÉRY, O.; MEYLAN, P. Comparison of a multiplexed bead-based assay with an immunofluorescence and an enzyme-immuno assay for the assessment of Epstein–Barr virus serologic status. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 12, p. 1776–1782, dez. 2010.

DHAMA, K. et al. COVID-19, an emerging coronavirus infection: advances and prospects in designing and developing vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 6, p. 1232–1238, 2 jun. 2020.

DI GENNARO, F. et al. Coronavirus Diseases (COVID-19) Current Status and Future Perspectives: A Narrative Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 8, p. 2690, jan. 2020.

DOBEC, M. et al. Serology and serum DNA detection in shingles. **Swiss Medical Weekly**, v. 138, n. 3–4, p. 47–51, 26 jan. 2008.

DRAGO, F. et al. SARS-CoV-2 infection: the same virus can cause different cutaneous manifestations. **British Journal of Dermatology**, v. 183, n. 4, p. 788–788, out. 2020.

DUNMIRE, S. K.; VERGHESE, P. S.; BALFOUR, H. H. Primary Epstein-Barr virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 102, p. 84–92, maio 2018.

ELIASSEN, E.; HEMOND, C. C.; SANTORO, J. D. HHV-6-Associated Neurological Disease in Children: Epidemiologic, Clinical, Diagnostic, and Treatment Considerations. **Pediatric Neurology**, v. 105, p. 10–20, abr. 2020.

ENGELMANN, I. et al. Incidence and impact of herpes simplex and cytomegalovirus detection in the respiratory tract after lung transplantation: CMV and HSV post lung transplantation. **Transplant Infectious Disease**, v. 13, n. 3, p. 259–265, jun. 2011.

EVANS, A. S. Clinical syndromes associated with EB virus infection. **Advances in Internal Medicine**, v. 18, p. 77–93, 1972.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 5, p. 737–763, nov. 2007.

FATTAL, I. et al. Epstein-Barr virus antibodies mark systemic lupus erythematosus and scleroderma patients negative for anti-DNA. **Immunology**, v. 141, n. 2, p. 276–285, fev. 2014.

FLEMINGTON, E. K. Herpesvirus Lytic Replication and the Cell Cycle: Arresting New Developments. **Journal of Virology**, v. 75, n. 10, p. 4475–4481, 15 maio 2001.

GAO, Y. et al. Diagnostic Utility of Clinical Laboratory Data Determinations for Patients with the Severe COVID-19. **Journal of Medical Virology**, p. jmv.25770, 17 mar. 2020.

GARCÍA-GONZÁLEZ, A. I.; ROSAS-CARRASCO, O. [Herpes zoster and post-herpetic neuralgia in the elderly: Particularities in prevention, diagnosis, and treatment]. **Gaceta Medica De Mexico**, v. 153, n. 1, p. 92–101, fev. 2017.

GÉRAUDIE, B. et al. Quantitation of human herpesvirus-6A, -6B and -7 DNAs in whole blood, mononuclear and polymorphonuclear cell fractions from healthy blood donors. **Journal of Clinical Virology**, v. 53, n. 2, p. 151–155, fev. 2012.

GERSHON, A. A. et al. Varicella zoster virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15016, 17 dez. 2015.

GILDEN, D. et al. Neurological Disease Produced by Varicella Zoster Virus Reactivation Without Rash. In: ABENDROTH, A.; ARVIN, A. M.; MOFFAT, J. F. (Eds.). . **Varicella-zoster Virus**. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. v. 342p. 243–253.

GUAN, W. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 30 abr. 2020.

GUY, J. S. et al. Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4523–4526, dez. 2000.

HABAS, K. et al. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 18, n. 12, p. 1201–1211, 1 dez. 2020.

HABIBZADEH, P.; STONEMAN, E. K. The Novel Coronavirus: A Bird's Eye View. **The International Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 11, n. 2, p. 65–71, 5 fev. 2020.

HAGE, E. et al. Characterization of Human Cytomegalovirus Genome Diversity in Immunocompromised Hosts by Whole-Genome Sequencing Directly From Clinical Specimens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 11, p. 1673–1683, 1 jun. 2017.

HASHEMI, S. A. et al. Co-infection with COVID-19 and Influenza A Virus in two died patients with Acute Respiratory Syndrome, Bojnurd, Iran. **Journal of Medical Virology**, v. n/a, n. n/a, 15 maio 2020.

HAYDEN, R. T. et al. (EDS.). Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus. In: **Diagnostic Microbiology of the Immunocompromised Host, Second Edition**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2016. p. 135–156.

Histórico da pandemia de COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>>. Acesso em: 14 jul. 2021.

HSUEH, P.-R. et al. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1062–1066, dez. 2004.

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, 15 fev. 2020.

JIH, J. et al. Epidemiological Features and Costs of Herpes Zoster in Taiwan: a National Study 2000 to 2006. **Acta Dermato Venereologica**, v. 89, n. 6, p. 612–616, 2009.

JIN, Y. et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 372, 27 mar. 2020.

JUNG, B. F. et al. Risk factors for postherpetic neuralgia in patients with herpes zoster. **Neurology**, v. 62, n. 9, p. 1545–1551, 11 maio 2004.

JUNG, D.; DORR, A. Single-Dose Pharmacokinetics of Valganciclovir in HIV- and CMV-Seropositive Subjects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, n. 8, p. 800–804, ago. 1999.

KAFUKO, G. W. et al. EPSTEIN-BARR VIRUS ANTIBODY LEVELS IN CHILDREN FROM THE WEST NILE DISTRICT OF UGANDA. **The Lancet**, v. 299, n. 7753, p. 706–709, abr. 1972.

KARADAĞ GEÇGEL, S. et al. [Evaluation of PCR results in the diagnosis of Epstein-Barr virus infections]. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 46, n. 4, p. 594–606, out. 2012.

KERR, J. R. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation and therapeutic inhibitors. **Journal of Clinical Pathology**, v. 72, n. 10, p. 651–658, out. 2019.

KIM, D. et al. Rates of Co-infection Between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. **JAMA**, v. 323, n. 20, p. 2085, 26 maio 2020.

KOIRALA, A. et al. Vaccines for COVID-19: The current state of play. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 35, p. 43–49, set. 2020.

KOLOKOTRONIS, A.; DOUMAS, S. Herpes simplex virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic gingivostomatitis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 3, p. 202–211, mar. 2006.

KOSHY, E. et al. Epidemiology, treatment and prevention of herpes zoster: A comprehensive review. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 84, n. 3, p. 251, 2018.

KSIAZEK, T. G. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1953–1966, 15 maio 2003.

LACHMANN, R. et al. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200267, 25 jul. 2018.

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? **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, p. S1684-1182(20)30127–4, 23 maio 2020a.

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? **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, p. S1684-1182(20)30127–4, 23 maio 2020b.

LAI, S.-W. et al. Herpes zoster could be an early manifestation of undiagnosed human immunodeficiency virus infection. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 115, n. 5, p. 372–376, maio 2016.

LAU, J. S. Y. et al. Epstein-Barr virus encephalitis in solid organ transplantation. **The New Microbiologica**, v. 40, n. 3, p. 212–217, jul. 2017.

LAU, S. K. P. et al. Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2063–2071, jun. 2006.

LI, G.; DE CLERCQ, E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 3, p. 149–150, mar. 2020.

LIMA, L. R. P. et al. Diagnosis of human herpes virus 1 and 2 (HHV-1 and HHV-2): use of a synthetic standard curve for absolute quantification by real time polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 220–223, 16 fev. 2017.

LIN, D. et al. Co-infections of SARS-CoV-2 with multiple common respiratory pathogens in infected patients. **Science China Life Sciences**, v. 63, n. 4, p. 606–609, 1 abr. 2020.

LINO, K. et al. Pp65 antigenemia and cytomegalovirus diagnosis in patients with lupus nephritis: report of a series. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 40, n. 1, p. 44–52, 26 abr. 2018.

LOSSIUS, A. et al. Epstein-Barr Virus in Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis—Association and Causation. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3701–3730, 13 dez. 2012.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, fev. 2020.

LUDERER, R. et al. Real-time Epstein-Barr virus PCR for the diagnosis of primary EBV infections and EBV reactivation. **Molecular Diagnosis: A Journal Devoted to the Understanding of Human Disease Through the Clinical Application of Molecular Biology**, v. 9, n. 4, p. 195–200, 2005.

MAFFINI, E. et al. Treatment of CMV infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Expert Review of Hematology**, v. 9, n. 6, p. 585–596, 2 jun. 2016.

MAIA, C. et al. [Clinical and Epidemiological Study of Complicated Infection by Varicella-Zoster Virus in the Pediatric Age]. **Acta Medica Portuguesa**, v. 28, n. 6, p. 741–748, dez. 2015.

MALIK, Y. S. et al. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV)—current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. **Veterinary Quarterly**, v. 40, n. 1, p. 68–76, 1 jan. 2020.

MARIN, M. et al. Prevention of varicella: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports**, v. 56, n. RR-4, p. 1–40, 22 jun. 2007.

Ministério da Saúde: Boletim Epidemiológico nº01, Secretaria de Vigilância em Saúde (COE COVID-19 – janeiro/2020).

Ministério da Saúde: Boletim Epidemiológico nº02, Secretaria de Vigilância em Saúde (COE COVID-19 – 10/02/2020).

Ministério da Saúde: Boletim Epidemiológico nº03, Secretaria de Vigilância em Saúde (COE COVID-19 – 14/02/2020).

MCGONAGLE, D. et al. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 6, p. 102537, jun. 2020.

MOHAMADIAN, M. et al. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. **The Journal of Gene Medicine**, v. 23, n. 2, p. e3303, fev. 2021.

NILLER, H.-H.; BAUER, G. Epstein-Barr Virus: Clinical Diagnostics. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1532, p. 33–55, 2017.

NYSTAD, T. W.; MYRMEL, H. Prevalence of primary versus reactivated Epstein-Barr virus infection in patients with VCA IgG-, VCA IgM- and EBNA-1-antibodies and suspected infectious mononucleosis. **Journal of Clinical Virology**, v. 38, n. 4, p. 292–297, abr. 2007.

OAKLEY, C.; EPSTEIN, J. B.; SHERLOCK, C. H. Reactivation of oral herpes simplex virus. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 84, n. 3, p. 272–278, set. 1997.

O'CALLAGHAN, K. P.; BLATZ, A. M.; OFFIT, P. A. Developing a SARS-CoV-2 Vaccine at Warp Speed. **JAMA**, v. 324, n. 5, p. 437, 4 ago. 2020.

OKANO, M. et al. Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection. **American Journal of Hematology**, v. 80, n. 1, p. 64–69, set. 2005.

OKBA, N. M. A. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 7, p. 1478–1488, jul. 2020.

Painel Covid. Prefeitura Municipal de Niterói, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.niteroi.rj.gov.br/painelcovid/>>. Acesso em: 14 jun. 2021

Painel Rio COVID-19. Disponível em: <<https://experience.arcgis.com/experience/38efc69787a346959c931568bd9e2cc4>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

PAN, F. et al. Time Course of Lung Changes at Chest CT during Recovery from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Radiology**, v. 295, n. 3, p. 715–721, jun. 2020.

PEERI, N. C. et al. The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? **International Journal of Epidemiology**, v. 49, n. 3, p. 717–726, 1 jun. 2020.

PETROSILLO, N. et al. COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 6, p. 729–734, jun. 2020.

POOLE, C. L.; JAMES, S. H. Antiviral Therapies for Herpesviruses: Current Agents and New Directions. **Clinical Therapeutics**, v. 40, n. 8, p. 1282–1298, ago. 2018.

PRICHARD, M. N.; WHITLEY, R. J. The development of new therapies for human herpesvirus 6. **Current Opinion in Virology**, v. 9, p. 148–153, dez. 2014.

PYRC, K.; BERKHOUT, B.; VAN DER HOEK, L. Identification of new human coronaviruses. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, n. 2, p. 245–253, abr. 2007.

QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 762–768, 28 jul. 2020.

RASMUSSEN, N. et al. Antibodies to early EBV, CMV, and HHV6 antigens in systemic lupus erythematosus patients. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 44, n. 2, p. 143–149, 4 mar. 2015.

RAZEGHI, E. et al. Clinical Manifestation, Laboratory Findings, and the Response of Treatment in Kidney Transplant Recipients With CMV Infection. **Transplantation Proceedings**, v. 39, n. 4, p. 993–996, 1 maio 2007.

RAZONABLE, R. R.; PAYA, C. V. Valganciclovir for the prevention and treatment of cytomegalovirus disease in immunocompromised hosts. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 2, n. 1, p. 27–41, fev. 2004.

RECHENCHOSKI, D. Z. et al. Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 151–156, 1 mar. 2017.

REYMEN, D. et al. Antiviral activity of selected acyclic nucleoside analogues against human herpesvirus 6. **Antiviral Research**, v. 28, n. 4, p. 343–357, dez. 1995.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. et al. COVID-19 in Latin America: The implications of the first confirmed case in Brazil. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 35, p. 101613, maio 2020.

ROIZMANN, B. et al. The family Herpesviridae: an update. **Archives of Virology**, v. 123, n. 3–4, p. 425–449, set. 1992.

ROMANOS, M. T. V.; SANTOS, N. S. DE O.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. Edição: 3^a ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2015.

SAFRONETZ, D.; HUMAR, A.; TIPPLES, G. A. Differentiation and quantitation of human herpesviruses 6A, 6B and 7 by real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 112, n. 1–2, p. 99–105, set. 2003.

SAGHAZADEH, A.; REZAEI, N. Immune-epidemiological parameters of the novel coronavirus – a perspective. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 16, n. 5, p. 465–470, 3 maio 2020.

SCHEFFEL, T. B. et al. • INFECÇÃO CITOMEGÁLICA PÓS-TRANSPLANTE RENAL. **Jornal Brasileiro de Transplantes**, v. 18, n. 1, p. 16–25, mar. 2015.

SCHMADER, K. Herpes Zoster. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 3, p. ITC17, 7 ago. 2018.

SCOTT, J. E.; DAVISON, A. J. The Complete DNA Sequence of Varicella-Zoster Virus. **Journal of General Virology**, v. 67, n. 9, p. 1759–1816, 1 set. 1986.

SEDLAK, R. H. et al. Identification of Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 by Droplet Digital PCR. **Clinical Chemistry**, v. 60, n. 5, p. 765–772, 1 maio 2014.

SHANG, W. et al. The outbreak of SARS-CoV-2 pneumonia calls for viral vaccines. **NPJ vaccines**, v. 5, p. 18, 2020.

SIMMONS, A. Clinical Manifestations and Treatment Considerations of Herpes Simplex Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. s1, p. S71–S77, 15 out. 2002.

TANAKA, T. et al. Rapid and simultaneous detection of 6 types of human herpes virus (herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, human herpes virus 6A/B, and human herpes virus 7) by multiplex PCR assay. **Biomedical Research**, v. 30, n. 5, p. 279–285, 2009.

TANG, B. et al. An updated estimation of the risk of transmission of the novel coronavirus (2019-nCov). **Infectious Disease Modelling**, v. 5, p. 248–255, 2020.

TOMBLYN, M. et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 15, n. 10, p. 1143–1238, out. 2009.

TOMTISHEN III, J. P. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 22, dez. 2012.

WANG, C. et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 470–473, fev. 2020a.

WANG, W. et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. **JAMA**, 11 mar. 2020b.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **The Lancet**, v. 357, n. 9267, p. 1513–1518, maio 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (2019-nCoV) infection is suspected: interim guidance, 28 January 2020**. Geneva: World Health Organization, 2020. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330893>>.

WU, Y.-C.; CHEN, C.-S.; CHAN, Y.-J. The outbreak of COVID-19: An overview. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 83, n. 3, p. 217–220, mar. 2020.

YADAV, T. et al. Recombinant vaccines for COVID-19. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 12, p. 2905–2912, 1 dez. 2020.

YAMANISHI, K. et al. IDENTIFICATION OF HUMAN HERPESVIRUS-6 AS A CAUSAL AGENT FOR EXANTHEM SUBITUM. **The Lancet**, v. 331, n. 8594, p. 1065–1067, maio 1988.

YIP, C. C. Y. et al. Comparative evaluation of a laboratory developed real-time PCR assay and the RealStar ® HHV-6 PCR Kit for quantitative detection of human herpesvirus 6. **Journal of Virological Methods**, v. 246, p. 112–116, ago. 2017.

YONGCHEN, Z. et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 833–836, 1 jan. 2020.

ZHANG, B. et al. **Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19**. [s.l.] *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*, 27 fev. 2020. Disponível em: <<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.02.26.20028191>>. Acesso em: 12 maio. 2021.

ZHAO, J. et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 16, p. 2027–2034, 19 nov. 2020.

ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 28 mar. 2020.

ZHU, X. et al. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. **Virus Research**, v. 285, p. 198005, ago. 2020.

APÊNDICE 1 – FICHA DE COLETA DE DADOS DE PRONTUÁRIO

PROTOCOLO DE PESQUISA AO PRONTUÁRIO				
NOME DO PACIENTE:				
PRONTUÁRIO:		CÓDIGO LAMAP:	SIGLA:	SEXO: F / M
IDADE:	DATA DE NASCIMENTO: / /		COR DA PELE: B / PD / PR / OUTRO	
BAIRRO/MUNICÍPIO:				
INTERNOU POR SUSPEITA DE COVID-19: S / N		DATA DA INTERNAÇÃO:		
DESENVOLVEU COVID-19 DURANTE A INTERNAÇÃO: S / N			ENFERMARIA:	
DATA DE INÍCIO DOS SINTOMAS: / /			DESFECHO:	
TEMPO DE INTERNAÇÃO EM DIAS:			DATA DO DESFECHO: / /	
MOTIVO DA INTERNAÇÃO:				
COMORBIDADES:				
HAS S / N	DM S / N	DRC S / N		HD S / N
CARDIOPATIA S / N		ASMA/DPOC S / N		INSUF. HEPÁTICA S / N
TUMOR SÓLIDO S / N			NEOPLASIA HEMATOLÓGICA S / N	
DÇ. AUTOIMUNE S / N		USO PRÉVIO DE IMUNOSSUPRESSOR S / N		
TRANSPLANTADO S / N			OBESIDADE S / N	
OUTROS:				
DATA DA SUSPEITA: / /				
SINTOMAS:				
FEBRE S / N (°C)	TOSSE S / N	DISPNEIA S / N	CORIZA S / N	OBSTR. NASAL S / N
DOR DE GARGANTA S / N	RINORRÉIA S / N	HIPÓXIA: S / N (SatO2 %)		ANOSMIA/AGEUSIA S / N
SINTOMAS GASTROINTESTINAIS:				
SINTOMAS DERMATOLÓGICOS:				
CEFALÉIA S / N	MALGA S / N	FADIGA S / N	OUTROS:	
DATA DO EXAME DE RT-PCR:			MATERIAL ANALISADO / RESULTADO DO TESTE:	
TESTE 1:				
TESTE 2:				

EVOLUÇÃO:			
DATA DE CUIDADOS INTENSIVOS: / /			TEMPO EM DIAS NO CTI:
COMPLICAÇÕES:			
IRA S / N	RECUPEROU-SE S / N	HD S / N	TEMPO DE HD EM DIAS:
IOT/VM S / N	DATA DA INTUBAÇÃO: / /	DATA DO DESMAME COM SUCESSO: / /	
INSUFICIENCIA HEPÁTICA S / N	MIOCARDIOPATIA S / N	COAGULOPATIA S / N	
USO DE AMINAS S / N	SEPSE/CHOQUE SÉPTICO S/N	TVP/TEP S / N	
INFECÇÃO NOSOCOMIAL: S / N		SD. HLH S / N	
USO DE ANTIBIÓTICOS/TEMPO EM DIAS:			
PARADA CARDIORRESPIRATÓRIA S / N		ACOMETIMENTO NEUROLÓGICO S / N	
OUTROS:			
ALTA DO CTI: / /		ALTA HOSPITALAR: / /	ÓBITO: / /
TOMOGRAFIAS DE TÓRAX:			
TC 1:	DATA / /	ACOMETIMENTO %	DERRAME PLEURAL S / N
DERRAME PERICARD. S / N	VIDRO FOSCO S/ N	CONDENSAÇÃO S / N	
OUTROS ACHADOS:			
TC 2:	DATA / /	ACOMETIMENTO %	DERRAME PLEURAL S / N
DERRAME PERICARD. S / N	VIDRO FOSCO S/ N	CONDENSAÇÃO S / N	
OUTROS ACHADOS:			
TC 3:	DATA / /	ACOMETIMENTO %	DERRAME PLEURAL S / N
DERRAME PERICARD. S / N	VIDRO FOSCO S/ N	CONDENSAÇÃO S / N	
OUTROS ACHADOS:			

ANEXO 1- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Implantação emergencial do desenvolvimento e infraestrutura ao apoio diagnóstico laboratorial do CORONAVÍRUS-19 pelo LAMAP (Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas) e correlações clínico-laboratoriais, diagnósticos diferenciais, evolução e desfechos em pacientes internados

Pesquisador: Jorge Reis Almeida

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);
A critério do CEP

Versão: 2

CAAE: 30623520.5.0000.5243

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.987.966

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1537870.pdf, de 14/04/2020).

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, foi identificado na província de Wuhan, na China, um aumento substancial do número de casos de pneumonia com causa desconhecida. (Malik et al. 2020, Wang et al. 2020, Wu et al. 2020). Os pacientes, que apresentaram um histórico em comum, tiveram suas amostras de lavado broncoalveolar testadas através de métodos de biologia molecular e um novo vírus foi identificado em 7 de janeiro de 2020. (Peeri et al. 2020) Da família Coronaviridae, patógenos responsáveis por causar doenças respiratórias, um novo coronavírus (SARS-CoV-2, primeiramente denominado 2019-nCoV) foi caracterizado como o responsável pela doença observada na China (COVID-19 do inglês Coronavirus disease 2019). (Malik et al. 2020, Wang et al. 2020).

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.987.966

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1537870.pdf	14/04/2020 20:19:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCOVID19090420.pdf	14/04/2020 20:18:25	Jorge Reis Almeida	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	RegulamentobiorrepositorioCOVID01042020.pdf	14/04/2020 20:18:13	Jorge Reis Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	TEXTOPLATAFORMA090420.pdf	14/04/2020 20:17:59	Jorge Reis Almeida	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAODOEUSOBIOR.pdf	14/04/2020 20:17:17	Jorge Reis Almeida	Aceito
Declaração de concordância	DeclaracaoConcordancia.pdf	14/04/2020 20:16:53	Jorge Reis Almeida	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	14/04/2020 19:36:02	Jorge Reis Almeida	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASILIA, 24 de Abril de 2020

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-040
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

ARTIGOS PUBLICADOS

BRAZ J INFECT DIS 2021;25(x x):101569



Sociedade
Brasileira de
Infectologia

The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Original article

Serum ferritin at admission in hospitalized COVID-19 patients as a predictor of mortality



Katia Lino^{a,b}, Gabriel Macedo Costa Guimarães^a, Lilian Santos Alves^a, Any Caroline Oliveira^a, Renan Faustino^a, Cintia Souza Fernandes^a, Gleiser Tupinambá^a, Thalia Medeiros^a, Andrea Alice da Silva^{a,c}, Jorge Reis Almeida^{a,d,*}

^a Multiuser Laboratory for Research Support in Nephrology and Medical Sciences (LAMAP), Faculty of Medicine, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, Rio de Janeiro, Brazil

^b Pediatric Rheumatology Unit, Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, Rio de Janeiro, Brazil

^c Department of Pathology, Faculty of Medicine, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, Rio de Janeiro, Brazil

^d Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2020

Accepted 10 February 2021

Available online 15 March 2021

Keywords:

SARS-CoV-2

Ferritin

Mortality

Cytokine storm

Hemophagocytic

lymphohistiocytosis

ABSTRACT

Introduction: Some COVID-19 patients have higher mortality and the responsible factors for this unfavorable outcome is still not well understood.

Objective: To study the association between ferritin levels at admission, representing an inflammatory state, and hospital mortality in COVID-19 patients.

Methods: From May through July 2020, SARS-CoV-2 positive patients with moderate to severe clinical symptoms were evaluated at admission, regarding clinical and laboratory data on renal and hepatic function, hematologic parameters, cytomegalovirus co-infection, and acute phase proteins.

Results: A total of 97 patients were included; mean age = 59.9 ± 16.3 years, 58.8% male, 57.7% non-white, in-hospital mortality = 45.4%. Age, ferritin, C-reactive protein, serum albumin and creatinine were significantly associated with mortality. Ferritin showed area under the curve (AUC) of 0.79 ($p < 0.001$) for the cut-off of 1873.0 ng/mL, sensitivity of 68.4% and specificity of 79.3% in predicting in-hospital mortality. Age ≥ 60 years had an odds ratio (OR) of 10.5 (95% CI = 1.8–59.5; $p = 0.008$) and ferritin ≥ 1873.0 ng/mL had an OR of 6.0 (95% CI = 1.4–26.2; $p = 0.016$), both independently associated with mortality based on logistic regression analysis.

Conclusion: The magnitude of inflammation present at admission of COVID-19 patients, represented by high ferritin levels, is independently predictive of in-hospital mortality.

© 2021 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail address: jorgereis@id.uff.br (J.R. Almeida).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101569>

1413-8670/© 2021 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ARTIGOS PUBLICADOS

ORIGINAL ARTICLE

J Bras Patol Med Lab. 2021; 57: 1-7.

Timeline analysis of IgA and IgG levels in Covid-19 hospitalized patients according to the clinical outcome

Análise temporal das concentrações de IgA e IgG em pacientes hospitalizados com Covid-19 de acordo com o desfecho clínico

Thalia Medeiros¹; Fabiana R. Carvalho¹; Renan Faustino¹; Gabriel M. C. Guimarães¹; Lillian S. Alves¹; Any Caroline Oliveira¹; Elzinandes L. Azeredo¹; Jorge R. Almeida¹; Luzia Maria O. Pinto¹; Andrea Alice Silva¹

1. Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. 2. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Studies suggest the association between antibody production and the severity of coronavirus disease 2019 (Covid-19). **Objectives:** To evaluate the concentrations of immunoglobulins class A (IgA) and class G (IgG) during the hospitalization period of Covid-19 patients according to the outcome (survival vs death). **Materials and methods:** Patients with severe acute respiratory syndrome of coronavirus 2 (Sars-CoV-2) infection confirmed by reverse transcriptase reaction followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) were included in this prospective study. Samples were obtained weekly during the follow-up of individuals, considering symptom onset. Titers of anti-Sars-CoV-2 IgA and IgG were measured using a commercial immunoassay. Correlations between IgA/IgG and cycle threshold (Ct) values for *N1* and *N2* target genes were also assessed. **Results:** We studied 55 Covid-19 patients (59.7±16.2 years, 63.6% male), of which 28 (50.9%) died. We observed IgA and IgG positivity (IgA+ and IgG+) in 90.9% and 80% of patients, respectively. The highest IgA+ frequency was observed at weeks 2 and 3 and the highest IgG+ at weeks 3 and 4. It is important to note that patients who died presented lower IgA titers in the first two weeks ($p < 0.05$); however, a significant increase in IgA levels was observed in the subsequent weeks. Lastly, we identified that significant correlations between Ct values and immunoglobulins levels, both IgA and IgG were correlated with Ct *N2* in patients who died. **Conclusion:** Our results suggest that lower IgA titers in early Covid-19, which is associated with lower Ct values, may indicate patients at higher risk for death.

Key words: antibodies; Covid-19; mortality.

RESUMO

Introdução: Estudos sugerem a associação entre a produção de anticorpos e a gravidade da coronavirus disease 2019 (Covid-19). **Objetivos:** Avaliar as concentrações de imunoglobulinas da classe A (IgA) e da classe G (IgG) durante a internação de pacientes com Covid-19 de acordo com o desfecho (sobrevivida vs óbito). **Materiais e métodos:** Pacientes com infecção pela síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (Sars-CoV-2) confirmada por reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foram incluídos neste estudo prospectivo. As amostras foram obtidas semanalmente durante o acompanhamento dos indivíduos, considerando o início dos sintomas. Os títulos de IgA e IgG anti-Sars-CoV-2 foram mensurados por meio de um imunoenensa comercial. Correlações entre IgA/IgG e valores de limiar de detecção [cycle thresholds (Ct)] para os genes alvo *N1* e *N2* também foram avaliadas. **Resultados:** Estudamos 55 pacientes com Covid-19 (59,7 ± 16,2 anos; 63,6% do sexo masculino); destes, 28 (50,9%) morreram. Observamos positividade para IgA e IgG (IgA+/IgG+) em 90,9% e 80% dos pacientes, respectivamente. A maior frequência de IgA+ foi verificada nas semanas 2 e 3, e a maior frequência de IgG+, nas semanas 3 e 4. É importante observar que os pacientes que morreram apresentam títulos de IgA mais baixos nas primeiras duas semanas ($p < 0,05$); no entanto, um aumento significativo na concentração de IgA foi observado nas semanas subsequentes.

First submission on 03/15/21; last submission on 03/17/21; accepted for publication on 03/17/21; published on 03/20/21

e4022021

1

ARTIGOS EM FASE DE SUBMISSÃO

Original Article

Hematological and coagulation parameters as predictors of death by COVID-19 in hospitalized patients: a Brazilian follow-up study

Running title: Hematological, coagulation parameters and death by COVID-19

Gabriel Macedo Costa Guimarães 1 * (gm_guimaraes@id.uff.br) – ORCID: 0000-0002-8213-1498

Renan Faustino 1 * (renanfaustino@id.uff.br) – ORCID: 0000-0002-0900-9672

Any Caroline Oliveira 1 (anycaroline@id.uff.br) - ORCID: 0000-0002-6027-587X

Lilian Santos Alves 1 (lilian_santos@id.uff.br) - ORCID: 0000-0001-8576-2239

Fabiana Rabe Carvalho 1 (fabianarc@id.uff.br) – ORCID: 0000-0002-4713-233X

Katia Lino Baptista 1 (katialino@id.uff.br) – ORCID: 0000-0002-6134-8495

Karina Yuriko Yaginuma 2 (karinayuriko@id.uff.br)

Hugo H. K. dos Santos 2 (hugosantos@id.uff.br)

Jorge Reis Almeida 1,3 (jralmeida@id.uff.br) - ORCID: 0000-0001-6155-7978

Thalia Medeiros 1 (thaliamedeiros@id.uff.br) - ORCID: 0000-0002-5642-4027

Andrea Alice da Silva 1,4 (aasilva@id.uff.br) - ORCID: 0000-0001-5856-6128

1 Multiuser Laboratory for Research Support in Nephrology and Medical Sciences (LAMAP), Hospital Universitario Antonio Pedro, Faculty of Medicine, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, Rio de Janeiro. Brazil.

2 Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, Rio de Janeiro. Brazil.

3 Department of Statistics, Institute of Mathematics and Statistics, Universidade Federal Fluminense

4 Department of Pathology, Faculty of Medicine, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. Brazil.

*Correspondent author: Andrea Alice da Silva – Multiuser Laboratory for Research

Support in Nephrology and Medical Sciences (LAMAP), Hospital Universitário Antonio Pedro, Faculty of Medicine, Universidade Federal Fluminense. Marquês de Paraná, 303 – 24033-900. Rio de Janeiro, Brazil. Zip code: 24033-900. Phone number: (+5521) 3674-7285. E-mail: aasilva@id.uff.br

The authors declare no conflict of interest.

ARTIGOS EM FASE DE SUBMISSÃO

ORIGINAL ARTICLE – Clinical Investigation

Title: RT-PCR cycle thresholds of SARS-CoV-2 N1 and N2 gene targets may help to predict mortality in COVID-19 hospitalized patients

Running title: Cycle thresholds as predictors of mortality in COVID-19 patients.

T. Medeiros^{1*}, C.F. de Souza^{1*}, F.R. Carvalho¹, R. Faustino¹, L.S. Alves¹, K. Lino¹, M.M. Siqueira⁵, D. Brown⁵, F.C. Motta⁵, A.A. Silva^{1,4}, F. Aguiar-Alves³, J.R. Almeida^{1,2}

*TM and CFS equally contributed to this study.

1.Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro, Brazil. 2. Departamento de Medicina Clínica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro, Brazil. 3. Laboratório de Epidemiologia Molecular e Biotecnologia (LEMB), Laboratório Universitário Rodolpho Albino (LURA), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro, Brazil. 4. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro, Brazil. 5. Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz - Rio de Janeiro, Brazil.

All authors confirm that there is no conflict of interest.

Funding: This work was supported by CAPES (#001), Prefeitura Municipal de Niterói (#37, #306), Ministério da Educação e Cultura (MEC), Universidade Federal Fluminense (PROAD/UFF), and Brazilian National Research Council/CNPq (#27968*6 FINEP/RTR/PRPq/RedevCOVID-19).

*Corresponding Author. Jorge Reis Almeida - Multiuser Laboratory for Research Support in Nephrology and Medical Sciences, Faculty of Medicine, Universidade Federal Fluminense. 303 Marques do Paraná, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. Contact: +55 (21) 32747286; e-mail: jorgereis@id.uff.br, thaliamedeiros@id.uff.br

ARTIGOS EM FASE DE ELABORAÇÃO E REVISÃO

"Presence and clinical impact of human Herpesvirus-6 infection in patients with moderate to critical Coronavirus diseases-19"

Lilian Santos Alves 1,3 (lilian_santos@id.uff.br)

Katia Lino 1,5,6 (linokatia@gmail.com)

Jessica Vasques Raposo 7 (jessicavasquesr@gmail.com)

Cintia Fernandes Souza 1,5 (cinttiafs@yahoo.com.br)

Thalia Medeiros 1,4 (thaliamedeiros@id.uff.br)

Andrea Alice da Silva 1,3 (aasilva@id.uff.br)

Jorge Reis Almeida 1,2 (jorgereis@id.uff.br)

Vanessa de Paula 7 (vdepaula@ioc.fiocruz.br)

1 Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa em Nefrologia e Ciências Médicas; 2 Department of Clinical Medicine; 3 Department of Pathology; 4 Post graduation Program in Pathology; 5 Post graduation Program in Medical Sciences. Faculdade de Medicina, UFF, Niterói, Brazil. 6 Pediatric Rheumatology, Hospital Universitário Antônio Pedro, Niterói, Brazil. 7 Laboratório de Virologia Molecular-Fiocruz

*Corresponding author: Jorge Reis Almeida. LAMAP – Laboratório Multiusuário de Apoio a Pesquisas em Nefrologia e Ciências Médicas. Hospital Universitário Antônio Pedro. Rua Marques de Paraná, 303. Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. CEP: 24033-900. Phone: (+55 21) 3674-7290. E-mail: jorgereis@id.uff.br

The authors declare no financial conflicts of interests. The work was supported by the Federal Fluminense University, a Brazilian public academic institution.