

VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES INTERNADOS COM COVID-19 NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL DE MARINGÁ

Ana Paula Brustolin Campos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini (Orientador), e-mail: dabertolini@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área: Microbiologia / Subárea: Virologia

Palavras-chave: SARS-CoV-2, via fecal-oral, RT-PCR

Resumo

O diagnóstico laboratorial realizado para determinar a alta hospitalar de pacientes com COVID-19 é a RT-qPCR em amostras de swabs de naso e orofaringe, junto a melhora clínica do paciente. Entretanto, estudos apontam a presença de RNA viral nas fezes, mesmo após a negatização dos swabs da faringe. Esses achados levantam preocupações se os pacientes com swabs faríngeos negativos estão realmente livres de vírus ou se são necessárias análises de outras amostras biológicas. O objetivo desse estudo foi analisar se os pacientes curados da infecção pelo SARS-CoV-2 internados no Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM) ainda continuam liberando o vírus nas fezes, e se há uma tendência de isto acontecer de acordo com a gravidade da infecção. Foram analisadas onze amostras de swab anal de pacientes com COVID-19, em estado grave, pela metodologia de RT-qPCR, seguindo o protocolo do *Centers for Disease Control and Prevention* dos Estados Unidos da América. Dentre os pacientes 37% eram mulheres e 68% homens, com uma média de idade de 54 anos (37-70 anos). Uma amostra apresentou resultado inconclusivo e as demais, resultado não detectável. Desta forma, pode-se concluir que provavelmente que o SARS-CoV-2 não está presente nas fezes dos pacientes após 21 dias do início dos sintomas, discordando do relatado na literatura consultada.

Introdução

Em dezembro de 2019, a Organização Mundial de Saúde foi informada sobre o aparecimento de casos de pneumonia de causa desconhecida, em Wuhan, na província de Hubei na China. Após investigações intensas, o agente causador dessas infecções foi isolado e a epidemia foi relacionada a um novo coronavírus (CoV), denominado de SARS-CoV-2 (WANG, C. *et al.*, 2020).

A COVID-19 é uma doença infecciosa cujos sintomas mais comuns são febre, cansaço e tosse seca, porém outros sintomas como perdas de olfato e/ou paladar e sintomas gastrointestinais como vômitos, diarreia e dor abdominal podem acometer uma pequena parcela da população (WANG *et al.*, 2020).

Apesar da principal via de transmissão aceita até o momento ser a via respiratória, através de gotículas, aerossóis e fômites contendo partículas virais viáveis, estudos têm demonstrado também a presença de RNA viral em diferentes amostras biológicas, entre as quais plasma, fezes e amostras de swab anal, levantando um questionamento sobre a existência de outras rotas de transmissão viral, da qual se destaca a via fecal-oral (PANet *et al.*, 2020).

O diagnóstico laboratorial é de grande importância para o manejo clínico do paciente e contactantes, uma vez que se trata de um vírus de alta transmissibilidade. A metodologia de escolha para o diagnóstico do SARS-CoV-2 é o RT-PCR, e as amostras utilizadas são swabs combinados de naso e orofaringe. A negativação de duas amostras de swab nasofaríngeo num intervalo de 24 horas somado a melhora clínica, são determinantes na adequação da alta hospitalar de um paciente e na liberação das medidas de isolamento social (BRASIL, 2020). Chen *et al.* (2020), ao estudarem 42 pacientes infectados com a COVID-19, verificaram a presença do RNA do SARS-CoV-2 nas fezes de 66,7% desses pacientes e, mais importante ainda, 64,3% desses permaneceram positivo para o RNA viral nas fezes por até 7 dias após o swab faríngeo ficar indetectável (CHEN *et al.*, 2020). Esses achados levantam preocupações se os pacientes com swabs faríngeos negativos estão realmente livres de vírus ou se são necessárias análises de outras amostras biológicas.

Surpreendentemente, Wu *et al.* (2020) reportaram que o paciente infectado com a COVID-19 tem amostras fecais positivas por 33 dias continuamente após as amostras respiratórias tornarem-se negativas (WU *et al.*, 2020). No entanto, devido ao pequeno número de amostras avaliadas por esses estudos, faltam dados clínicos para comparação de resultados, desta forma, o objetivo deste projeto foi analisar se os pacientes curados da infecção pelo SARS-CoV-2 ainda continuam liberando o vírus nas fezes e se existe uma tendência de acordo com a gravidade da infecção.

Materiais e métodos

Coleta e armazenamento das amostras

A coleta do material da região anal, foi realizada utilizando swab de Rayon, acondicionado em Meio de Transporte Viral em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM) internados, com cerca de 21 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas. A coleta do swab anal foi realizada junto à coleta de material para a vigilância de bactérias multirresistentes, padronizado pela Comissão de Controle de Infecção Hospital (CCIH), acompanhada por alunos de doutorado, em companhia dos profissionais e técnicos do Laboratório de Análises Clínicas do HURM, obedecendo aos seus horários de coleta de material biológico e com devida aprovação no Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – COPEP.

As amostras ficaram armazenados em ultra freezer a -80°C no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (LEPAC-UEM) até a realização da técnica de RT-qPCR. A realização da técnica de RT-qPCR foi realizada no setor de Virologia Clínica do LEPAC.

Extração do RNA viral e RT-qPCR

A extração do RNA viral foi realizada com o kit MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit,

de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA extraído foi analisado pela metodologia de RT-qPCR, seguindo o protocolo do CDC - CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (CDC, 2021), onde foi utilizado o master mix Promega GoTaq® Probe 1- StepRT-qPCR System (Promega, Madison, EUA), tendo como alvo os genes N1 e N2 (IDT, Síntese Biotecnologia, Belo Horizonte, Minas Gerais), e, como controle interno, o gene da RNaseP e, como controle positivo, RNA sintético (CORMAN *et al.*, 2020). Para a reação de amplificação em tempo real foi utilizado o equipamento Applied Biosystems™ 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) com a seguinte termociclagem: 15 minutos para a transcrição reversa, seguido de 95°C por 2 minutos e 45 ciclos de 95°C por 3 s, 55°C por 30 s.

Dados clínicos

Os dados clínicos como sintomatologia, comorbidades e os dados epidemiológicos foram acessados pelo prontuário dos pacientes atendidos no HUM, pelo Sistema de Gestão da Assistência de Saúde do SUS (GSUS).

Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UEM (CAAE 33118420.9.0000.0104).

Resultados e Discussão

Foram analisadas onze amostras de swab anal de pacientes com COVID-19, em estado grave, dentre os quais 37% eram mulheres e 68% homens, com uma idade média de 54 anos (37-70 anos).

Desses pacientes, 54% estavam internados na UTI-COVID do HURM, e o restante na enfermaria. As amostras foram coletadas numa média de 21 dias após início dos sintomas, sendo que os sintomas relatados com maior frequência foram febre (54,5%), dispneia (63,6%), coriza (27,2%) e desconforto respiratório (27,2%).

Apenas um paciente deu resultado detectável para N1, mas o resultado é considerado inconclusivo, pois não houve detecção do gene N2. Para que um resultado seja considerado detectável, deve ocorrer detecção para os dois genes abaixo de 40 ciclos da RT-qPCR (Ct). As demais amostras foram todas não detectáveis para os dois genes do vírus SARS-CoV-2. Nossos resultados discordam dos que foram relatados na literatura consultada (CHEN, C. *et al.*, 2020; WU, Y. *et al.*, 2020).

Conclusões

Embora as amostras de swab anal coletados tenham resultado não detectável para SARS-CoV-2, a via fecal-oral deve continuar sendo objeto de estudo como via de transmissão do coronavírus, a fim de avaliar a necessidade de realização de análises de outras amostras biológicas, além do swab nasofaríngeo, para a alta hospitalar de pacientes infectados. Os resultados obtidos nesse estudo justificam uma pesquisa mais aprofundada sobre o assunto, incluindo a coleta de amostras seriadas de cada paciente e um cronograma bem definido, bem como um número maior de pacientes para serem avaliados.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa concedida e à equipe do laboratório de Virologia Clínica pelo auxílio na realização deste projeto.

Referências

BRASIL, M. D. S. D. **PROTOCOLO DE MANEJO CLÍNICO DO CORONAVÍRUS (COVID-19) NA ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE**. Versão 7. Abril/2020. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/202004/14140606-4-ms-protocolomanejo-aps-ver07abril.pdf>

Centers for Disease Control and Prevention *et al.* CDC 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Diagnostic Panel. 2020.CDC-006-00019, Revision: 07. Effective: 07/21/2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>

CHEN, C. *et al.* SARS-CoV-2–positive sputum and feces after conversion of pharyngeal samples in patients with COVID-19. **Annals of internal medicine**, v. 172, n. 12, p. 832-834, Jun 2020.

CORMAN, V. M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, p. 2000045, Jan 2020.

PAN, X. *et al.* Asymptomatic cases in a family cluster with SARS-CoV-2 infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 410-411, Feb 2020.

WANG, Chen *et al.* A novel coronavirus outbreak of global health concern. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 470-473, Jan 2020.

WU, Y. *et al.* Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 5, p. 434-435, May 2020.