

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Caroline Totelote Medeiros Pimenta Rodrigues

**OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS BACTERIANOS ASSOCIADOS A
INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS EM PACIENTES COM SUSPEITA
DE INFECÇÃO POR SARS-CoV-2.**

Rio de Janeiro
2022

Caroline Totelote Medeiros Pimenta Rodrigues

**OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS BACTERIANOS ASSOCIADOS A
INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS EM PACIENTES COM SUSPEITA
DE INFECÇÃO POR SARS-CoV-2.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Ivano de Filippis.
Coorientador: Dr. Marco Aurélio Horta.

Rio de Janeiro
2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Rodrigues , Carolaine

Ocorrência de Patógenos Bacterianos Associados a Infecções Respiratórias Agudas em Pacientes Com Suspeita de Infecção Por Sars-CoV-2. / Carolaine Rodrigues . - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2022.

56 f. : fig. ; tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

Orientador: Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso.

Co-orientador: Marco Aurélio Pereira Horta.

1. Infecções respiratórias agudas. 2. Covid-19. 3. Coinfecção. 4. HRM. 5. Infecção bacteriana. I. Título.

Occurrence Of Bacterial Pathogens Associated With Acute Respiratory Infections In Patients With Suspected Sars-CoV-2 Infection.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Caroline Totelote Medeiros Pimenta Rodrigues

**OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS BACTERIANOS ASSOCIADOS A
INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS EM PACIENTES COM SUSPEITA
DE INFECÇÃO POR SARS-CoV-2.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Dra. Renata Freire Alves Pereira
UFF - Universidade Federal Fluminense.

Dr. Kayo Cesar Bianco Fernandes
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

ORIENTADORES

Prof. Dr. Ivano de Filippis
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Horta
IOC- Instituto Oswaldo Cruz.

“Dedico a Deus e a minha família que
contribuíram e deram forças para que eu
pudesse concluir mais uma etapa.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir mais uma conquista e por sempre me dar forças para superar qualquer desafio.

A minha família, em especial a minha vó Laurita e a meu tio Elson, por me incentivarem a cada dia e por acreditarem na minha capacidade.

Aos meus pais Ademir e Elaine, agradeço imensamente por todos os seus ensinamentos, pelo exemplo e lições de vida, pela educação que me deu e por todos os esforços que sempre fez para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus irmãos Victor e Emerson Lucas, por todo incentivo, sempre torcendo pelas minhas conquistas.

Ao meu esposo, Thiago por todos os momentos de companheirismo, apoio incondicional, compreensão, encorajamento, incentivo e principalmente os momentos de escuta.

A meus amigos, que sempre estiveram presentes mesmo que de longe, especialmente a Liliane Ribeiro e Verônica Sousa, que me acompanham há tantos anos e sempre acreditaram e me encorajaram a ir atrás dos meus sonhos e objetivos.

A Letícia Gouveia, Priscila Rodrigues e Bianca Costa pela amizade, convivência no laboratório, companhia no INCQS, pelas conversas e palavras de incentivo.

Aos meus orientadores, em especial ao Dr. Ivano de Filippis, por ter me aceitado como aluna, muito obrigada por toda a paciência e disponibilidade ao ensinar, apoio, incentivo e pela confiança no meu trabalho.

Ao Laboratório *NB3* e ao laboratório LMR, onde tive a oportunidade de desenvolver este projeto pelo qual tenho um grande carinho e as pessoas que sempre estiveram dispostas a me ajudar.

Ao Dr. Kayo Bianco, Dra Débora Ribeiro e MSc. Ana Carolina e Sarah Sousa pela ajuda no sequenciamento e manipulação dos equipamentos utilizados nesse estudo. Agradeço a enorme ajuda, por toda a atenção e paciência que tiveram comigo.

Agradeço, em especial a Dra Célia Romão, por quem tenho um carinho enorme e que vem me acompanhando desde 2016.

À toda a banca avaliadora por estar disponível e ter aceitado o convite gentilmente.

Ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ e CAPES, pelo apoio financeiro e por me permitirem aprimorar meus conhecimentos e concluir esse trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram comigo durante esta etapa e que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

As infecções respiratórias são doenças que ocorrem no trato respiratório, que podem variar desde infecção leve, como resfriado, até condições mais graves, como pneumonia. As principais infecções do trato respiratório inferior são as infecções respiratórias agudas, causadas principalmente por vírus ou bactérias. Estima-se que anualmente cerca de quatro milhões de pessoas morrem de infecções do trato respiratório no mundo. Durante a pandemia da Covid-19 houve um aumento de casos de pneumonia, com muitos casos graves, podendo estar associados a coinfeção bacteriana. A pandemia gerou grandes impactos, principalmente no sistema de saúde pública do país, levando a necessidade de implementação de medidas para controle e prevenção da doença. O objetivo desse estudo foi detectar a presença de patógenos bacterianos em amostras de pacientes com suspeita de infecção pelo SARS-CoV-2, utilizando qPCR-HRM como método de identificação. Um total de 166 amostras positivas e 188 negativas para Covid-19, coletadas das vias aéreas superiores, foram analisadas utilizando os termocicladores *Rotor-Gene Q 5-plex HRM* e *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Systems* e confirmadas pelo sequenciamento de *Sanger*. De forma geral, a metodologia utilizada mostrou alta sensibilidade, permitindo identificar os patógenos bacterianos, baseado nas curvas de Melting (T_m) dos genes alvo. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a associação do vírus da Covid-19 com patógenos bacterianos seja responsável pelo aumento da gravidade dos casos, visto que, em 55,2% das amostras de pacientes considerados em estado grave ou crítico, de acordo com a classificação do Ministério da Saúde, foi detectado pelo menos um patógeno bacteriano. O microrganismo mais detectado foi *S. pneumoniae* com 31,3%, seguido por *H. influenzae* (21,7%) e *M. pneumoniae* (7,6%). Do total de amostras analisadas, em 14,4% foram detectados dois patógenos bacterianos simultaneamente. A padronização de um método rápido e eficaz e de baixo custo como a qPCR-HRM, em laboratórios de referência e hospitais públicos, é fundamental para direcionar as ações de vigilância em saúde. Essas informações podem auxiliar na vigilância epidemiológica e nas estratégias para evitar novos surtos e aumento da mortalidade de pacientes com Infecção Respiratória Aguda (IRA).

Palavras-chave: Infecções respiratórias agudas, Covid-19, coinfeção, HRM, infecção bacteriana.

ABSTRACT

Respiratory infections are diseases that occur in the respiratory tract, which can range from a mild infection, such as a cold, to more serious conditions, such as pneumonia. The main lower respiratory tract infections are acute respiratory infections, mainly caused by viruses or bacteria. It is estimated that annually about four million people die from respiratory tract infections worldwide. During the Covid-19 pandemic, there was an increase in cases of pneumonia, with many serious cases, which may be associated with bacterial coinfection. The pandemic generated major impacts, mainly on the country's public health system, leading to the need to implement measures to control and prevent the disease. The aim of this study was to detect the presence of bacterial pathogens in samples from patients with suspected SARS-CoV-2 infection, using qPCR-HRM as an identification method. A total of 166 positive and 188 negative samples for Covid-19, collected from the upper airways, were analyzed using the *Rotor-Gene Q 5-plex HRM and QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Systems* thermal cyclers and confirmed by Sanger sequencing. In general, the methodology used showed high sensitivity, allowing the identification of bacterial pathogens, based on the Melting curves (T_m) of the target genes. The results obtained in this study suggest that the association of the Covid-19 virus with bacterial pathogens is responsible for the increase in the severity of the cases, since, in 55.2% of the samples of patients considered to be in a serious or critical condition, according to the classification of the Ministry of Health, at least one bacterial pathogen was detected. The most detected microorganism was *S. pneumoniae* with 31.3%, followed by *H. influenzae* (21.7%) and *M. pneumoniae* (7.6%). Of the total of samples analyzed, in 14.4% two bacterial pathogens were detected simultaneously. The standardization of a fast, effective and low-cost method such as qPCR-HRM, in reference laboratories and public hospitals, is essential to direct health surveillance actions. This information can help in epidemiological surveillance and strategies to prevent new outbreaks and increased mortality in patients with Acute Respiratory Infection (ARI).

Keywords: Acute respiratory infection, Covid-19, coinfection, HRM, bacterial infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Preparo da diluição seriada.....31
- Figura 2** – Curva de *melting* das cepas de referência após diluição para determinação do LOD.....38
- Figura 3** – Curva de *melting* do gene *ply* em reação de qPCR- HRM multiplex....42
- Figura 4** – Curva de *melting* das cepas de referência em reação multiplex.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exames para detecção dos agentes em infecções respiratórias	24
Tabela 2 – Microrganismos de referência utilizados no estudo.....	30
Tabela 3 – Classificação dos casos conforme os sintomas relacionados à Covid-19.....	32
Tabela 4 – Protocolo das reações utilizando dois tipos de fluoróforos no termociclador QS7.....	34
Tabela 5 – Iniciadores utilizados para a amplificação pela qPCR-HRM.....	34
Tabela 6 – Temperatura de <i>Melting</i> (T_m) das cepas controles, obtidas por qPCR-HRM.....	37
Tabela 7 – Dosagem inicial e após diluição do DNA das cepas de referência utilizada.....	38
Tabela 8 – Confirmação dos resultados obtidos por HRM, por sequenciamento de <i>Sanger</i>	39
Tabela 9 – Resultados obtidos pela qPCR-HRM no QS7.....	41
Tabela 10 - Presença de bactérias em amostras positivas e negativas para Covid-19.....	44

LISTA DE SIGLAS

Am	Amostra
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAEE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Cdna	DNA complementar
Covid-19	Coronavirus disease
Ct	Cycle Threshold
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fg	Fentograma
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FISR	Fórum Internacional De Sociedades Respiratórias
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
Hi	<i>Haemophilus influenzae</i>
Hh	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
HRM	High Resolution Melt
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRA	Infecção Respiratória Aguda
LMR	Laboratório de Microrganismos de Referência
LOD	Limit of Detection
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Médio Oriente
Mp	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
MS	Ministério da Saúde

NB3	Laboratório de nível de Biossegurança 3
Ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAC	Pneumonia Adquirida na Comunidade
PCR	Polimerase Chain Reaction
qPCR	Polimerase Chain Reaction Real Time
QS7	QuantStudio 7
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
SARA	Síndrome da angústia respiratória
SARS-CoV	Síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV- 2	Síndrome respiratória aguda grave coronavirus 2
SBIM	Sociedade Brasileira de Imunizações
SBPT	Sociedade Brasileira de Pneumologia E Tisiologia
SIM/DATASUS	Sistema De Informação Sobre Mortalidade Hospitalar do departamento de Informática do Sistema Único De Saúde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
ST	Sequence Typing
Sp	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Tm	Temperatura de Melting
TSB	Caldo Trypticaseína Soja
µL	Microlitro
UNICEF	United Nations International Children's Emergency Fund
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Infecções Respiratórias Agudas	16
1.2 Coinfecção bacteriana e infecções secundárias	18
1.3 Etiologia das Infecções Respiratórias Agudas	19
1.3.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
1.3.2 <i>Haemophilus influenzae</i>	22
1.3.3 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	23
1.4 Diagnóstico das IRA	24
1.5 PCR em tempo real (qPCR)	25
1.5.1 qPCR-HRM	27
1.6 Justificativa	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 METODOLOGIA	30
3.1 Amostras controle.....	30
3.2 Seleção das amostras clínicas.....	31
3.3 Dados demográficos e critérios de inclusão e exclusão	31
3.4 Detecção dos patógenos bacterianos	32
4.5 Protocolo de reação	33

3.6 Confirmação da identificação	34
3.7 Avaliação da carga bacteriana com a gravidade do quadro clínico	35
3.8 Aspectos éticos	35
3.9 Análise estatística	36
4 RESULTADOS.....	36
4.1 qPCR-HRM	36
4.2 Limit of Detection (LOD)	36
4.3 Confirmação da identificação.....	38
4.4 Resultados obtidos por HRM	39
4.4.1 PCR-HRM Multiplex	41
4.5 Avaliação da carga bacteriana com a gravidade do quadro clínico	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	48
7 REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infecções Respiratórias Agudas

As infecções respiratórias são doenças que ocorrem no trato respiratório, tanto superior como inferior, levando à obstrução da passagem do ar a nível nasal, bronquiolar e pulmonar (WHO, 2015). As principais infecções do trato respiratório inferior são as infecções respiratórias agudas (IRA) que, são mais importantes em algumas faixas etárias, como em crianças e idosos, particularmente mais vulneráveis a essas complicações (CARDOSO, 2010).

Entre as infecções respiratórias, são encontradas desde resfriados comuns, até pneumonias. Na maioria das vezes, essas infecções têm etiologia viral, mas em alguns casos, como na pneumonia, por exemplo, a presença de bactérias deve ser considerada. Além disso, a doença constitui em uma das principais causas de demanda por consultas e hospitalização em crianças (ALVIM; LASMAR, 2009).

Mundialmente, as IRA são consideradas a principal causa de morbidade e mortalidade, seja em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, assumindo uma particular importância durante o inverno e em populações de risco. No entanto, nos países em desenvolvimento, esses índices aparecem mais altos, sendo as pneumonias as principais infecções respiratórias agudas, responsáveis por 14% de todas as mortes somente na faixa etária pediátrica, causando 740.180 mortes em 2019 (SBPT, 2007; WHO 2022b). Embora a incidência das infecções respiratórias seja semelhante, principalmente em crianças menores de cinco anos, percebemos uma diferença significativa em relação à frequência e a gravidade da doença em países emergentes (BLACK *et al.*, 2010; UNICEF, 2022).

Por definição geral a pneumonia é uma doença inflamatória aguda de causa infecciosa que acomete o trato respiratório inferior, causada, na maioria das vezes, por vírus e/ou bactérias (SOUZA, 2018). Neuman *et al.*, (2011) classifica a pneumonia como inflamação do parênquima pulmonar acompanhada de infecção do trato respiratório inferior, o que provoca importantes alterações em relação à ventilação e na mecânica respiratória, impedindo um padrão respiratório eficaz.

As características de apresentação da pneumonia viral e bacteriana são semelhantes. No entanto, os sintomas da pneumonia viral podem ser mais

numerosos do que os sintomas da pneumonia bacteriana. A maioria dos quadros de IRA ocorre após uma infecção viral de vias aéreas superiores, mas apenas a minoria desses quadros evolui para uma inflamação nos pulmões (ALVIM; LASMAR, 2009).

Segundo o Fórum Internacional de Sociedades Respiratórias (FISR, 2017), cerca de 4 milhões de pessoas morrem anualmente de infecções do trato respiratório em todo o mundo. No Brasil, cerca de 800.900 pessoas foram internadas com pneumonia no período de janeiro de 2020 a janeiro de 2022, segundo dados registrados pelo Sistema de Informação sobre mortalidade hospitalar do departamento de informática do Sistema Único de Saúde (SIM/DATASUS), desse total, 105.600 vieram a óbito.

A pneumonia é o resultado mais sério de IRA e mata mais crianças do que qualquer outra doença infecciosa. A cada 43 segundos uma criança morre pela doença. Durante a pandemia de Covid-19, riscos adicionais para a saúde e o bem-estar das crianças foram evidenciados, uma vez que a pandemia causou o colapso do sistema de saúde, visto que profissionais da saúde ficaram sobrecarregados e produtos para o tratamento, como o oxigênio e alguns medicamentos, ficaram escassos (UNICEF, 2022).

Entre os anos 1990 e 2015 houve uma redução das taxas de mortalidade por infecções do trato respiratório no país. Embora essas taxas estejam em queda (redução de 25,5%), as internações por pneumonia e os altos custos do tratamento continuam sendo desafios para a saúde pública (CORRÊA, 2018). Apesar da diminuição, nos últimos anos foi registrado um aumento significativo em relação às internações em todo o mundo, devido a atual pandemia da síndrome respiratória aguda grave causada pelo vírus SARS-CoV-2, e seus efeitos ainda estão em andamento (WHO, 2022a).

Este novo coronavírus é responsável pela doença classificada como Covid-19, provocando aumento das mortes por infecção respiratória no decorrer do ano seguinte e até hoje em diversos países (WHO, 2020a). Desde o início da pandemia, até 31 de outubro de 2022, foram registrados 34.828.749 casos de Covid-19 no país, totalizando cerca de 688.157 óbitos acumulados (BRASIL, 2022b).

O surgimento do novo coronavírus foi observado pela primeira vez quando casos de pneumonia inexplicada foram observados na cidade de Wuhan, na China (WHO, 2020b). Os coronavírus são zoonóticos, ou seja, são transmitidos entre

animais e pessoas. São uma grande família de vírus que causam doenças que vão desde o resfriado comum até condições mais graves, como a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e agora a síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2). A maioria das pessoas infectadas com o vírus da Covid-19 apresenta doença respiratória leve a moderada e se recuperam sem a necessidade de tratamento especial ou ainda podem ser portadoras assintomáticas. Idosos e indivíduos com comorbidades pré-existentes, como hipertensão, diabetes, doenças respiratórias crônicas e câncer, têm maior probabilidade de desenvolver a doença grave (WHO, 2020a). A doença ainda pode apresentar complicações respiratórias como a pneumonia e a síndrome da angústia respiratória aguda - SARA (BRASIL, 2020).

A possibilidade de coinfeção com outros patógenos respiratórios ainda é pouco conhecida. No entanto, essa deve ser uma preocupação importante para os médicos no manejo da Covid-19. (AVALOS *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020). Gayam e colaboradores (2020) descrevem que as coinfeções com Covid-19 podem resultar em sintomas respiratórios prolongados, permanência na UTI, além do aumento da morbimortalidade se não detectadas e tratadas de forma adequada.

1.2 Coinfeção bacteriana e infecções secundárias

As pandemias são geralmente de causa viral. Acredita-se que isso seja devido à alta taxa de mutação desses patógenos (HOLLAND, *et al.*, 1982). Uma complicação comum da doença respiratória viral pode ser a infecção bacteriana secundária. Esse tipo de infecção, como o nome sugere, é uma infecção que se desenvolve em pacientes após a infecção inicial a outro patógeno, comumente um vírus (MORRIS, *et al.*, 2017). Enquanto as infecções secundárias ocorrem em sucessão à infecção primária, as coinfeções são causadas por múltiplos patógenos e ocorrem simultaneamente, no entanto, em vez de uma combinação de vários patógenos, tende a haver um foco em um único patógeno (JAMIESON, *et al.*, 2010).

Uma série de infecções virais podem ser complicadas por coinfeção ou infecção secundária por uma variedade de bactérias, incluindo *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Essa associação pode levar a um aumento da gravidade de doenças, como a pneumonia, por exemplo (MORRIS, *et al.*, 2017).

Evidências epidemiológicas mostram que as infecções secundárias podem aumentar significativamente a morbidade e a mortalidade das infecções virais (GUPTA *et al.*, 2008).

Os mecanismos pelos quais a coinfeção e a infecção secundária ocorrem são muito diversos. Relatos de pandemias passadas, como a de influenza, mostram uma alta frequência de colonização por espécies bacterianas nos pulmões, bactérias essas que são comumente encontradas nas vias aéreas superiores. Evidências sugerem que as lesões causadas por vírus no trato respiratório inferior podem favorecer a aderência de bactérias patogênicas nas vias aéreas e no pulmão, e consequente infecção bacteriana secundária (JOSEPH; TOGAWA; SHINDO, 2013).

Durante a pandemia de influenza suína de 2009, houve um aumento nos casos de pneumonia hospitalar como resultado de pneumonia bacteriana secundária, que foi identificada em aproximadamente 55% das mortalidades (GILL, *et al.*, 2010). Observar essa associação é importante, pois tem implicações relevantes para o sistema de saúde em todo o mundo, principalmente porque esse tipo de infecção é conhecido por levar ao aumento da morbidade (SMITH; MCCULLERS, 2014).

1.3 Etiologia das Infecções Respiratórias Agudas

O trato respiratório superior hospeda uma microbiota diversa, dentro da qual uma série de patobiontes bacterianos podem ser encontrados, ou seja, espécies bacterianas que possuem um potencial de induzir processos inflamatórios, mas também podem ser transportadas de forma inofensiva (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012). Pequenas quantidades de bactérias patogênicas podem permanecer em nosso corpo sem consequências graves. Muitos desses microrganismos colonizam tecidos expostos, como a pele, e se tiverem oportunidade, estarão em posição favorável para invadir o corpo. A maioria dessas bactérias são cepas simbióticas que mantêm uma interação mutuamente benéfica com o hospedeiro, podendo fornecer funções úteis, como a proteção imunológica ao competir com cepas mais patogênicas (CAULEY; VELLA, 2015).

As doenças agudas do trato respiratório superior ou inferior podem resultar em diferentes aspectos, variando de infecção assintomática ou leve a doença grave

ou fatal, e sua gravidade depende do patógeno causador, de fatores ambientais e do hospedeiro (WHO, 2014). Na maior parte dos casos, as infecções respiratórias são causadas por vírus ou bactérias, com muitos casos de infecções mistas, que são as infecções com mais de um agente etiológico, como bactérias e vírus simultaneamente. As combinações mais comuns que ocorrem nesse tipo de infecção são entre *Streptococcus pneumoniae* e vírus sincicial respiratório (VSR) ou *Streptococcus pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* (ALVIM; LASMAR, 2009).

Apesar das infecções mais graves serem causadas por bactérias, infecções agudas causadas por vírus predispõem às infecções bacterianas. (STEIN; MAROSTICA, 2006). Vírus como o da Influenza possuem a capacidade de necrosar o epitélio, lesão típica da influenza na fase aguda que acaba favorecendo a aderência de bactérias, o que propicia ao surgimento de uma possível pneumonia bacteriana secundária (FILHO, 2006).

Entre os mais frequentes agentes virais causadores de IRA estão o vírus sincicial respiratório, os adenovírus, vírus influenza A e B e os vírus parainfluenza. Entretanto, novos patógenos são frequentemente relatados na literatura, incluindo coronavírus, bocavírus, metapneumovírus humano e o novo coronavírus SARS-CoV-2. As bactérias são uma das principais causas de infecções do trato respiratório inferior. Patógenos como; *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* são os principais causadores de pneumonia em muitos países (BEZERRA *et al.*, 2011; WHO, 2019; WHO, 2020^a).

A idade é o melhor preditor da etiologia e guia para a escolha de um tratamento apropriado. Em recém-natos, os agentes etiológicos mais comuns são bactérias Gram negativas, como *Escherichia coli* e mais raramente *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp e *Enterobacter* sp, e Gram positivas, como *Streptococcus* do grupo B e *Staphylococcus aureus*. Em crianças de um a três meses é causada por vírus respiratórios, *Chlamydia trachomatis* e *Bordetella pertussis*, ocasionando a Síndrome da pneumonia afebril do lactente. De 1 mês a 5 anos, a pneumonia pode ser causada por vírus, pelo *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus*. Já em crianças acima de 5 anos, os agentes etiológicos são, principalmente, *Mycoplasma pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae* (STEIN; MAROSTICA, 2006; ALVIM; LASMAR, 2009; LIAO., *et al.*, 2021).

1.3.1 *Streptococcus pneumoniae*

O *S. pneumoniae* é o agente infeccioso que mais comumente causa pneumonia bacteriana em crianças e adultos, posto que antes era ocupado por outra bactéria, a *H. influenzae* (SBIM, 2020). É um dos principais agentes etiológicos causadores de infecções adquiridas na comunidade, como pneumonia, meningite, bacteremia/septicemia, otite média e aguda, podendo habitar a nasofaringe de forma assintomática (WHITMAN, 2009).

Encontrado como um comensal do trato respiratório superior, é a bactéria mais comum em infecções bacterianas secundárias e está particularmente relacionada com o aumento da morbidade e mortalidade durante epidemias e pandemia de influenza (JOSEPH; TOGAWA; SHINDO, 2013). Isolado pela primeira vez em 1880, a descoberta ocorreu de forma independente e simultânea pelos pesquisadores Louis Pasteur e George Sternberg, e descrito pela primeira vez em 1884 por Klein. Posteriormente, em 1901, foi reclassificado como pneumococo por Chester, devido ao seu papel no desenvolvimento de casos de pneumonia (VERONESI; FOCACCIA, 2015).

A espécie *Streptococcus pneumoniae* (*Sp*), ou pneumococo, é uma bactéria Gram positiva, anaeróbica facultativa, que tem mais de 90 sorotipos imunologicamente distintos e de importância epidemiológica global. São alfa-hemolíticas, imóveis e não produzem esporos. A cápsula da bactéria tem papel importante na virulência e imunogenicidade e determina os sorotipos bacterianos, sendo seu principal fator de patogenicidade. Suas células se formam em cocos, na maioria das vezes formando pares ou cadeias curtas e ocasionalmente de forma individual (VERONESI; FOCACCIA, 2015).

As doenças pneumocócicas são consideradas uma das maiores causas de morbimortalidade, principalmente em países em desenvolvimento. O pneumococo é o agente etiológico de uma série de infecções, sendo o principal patógeno atribuído às pneumonias adquiridas na comunidade (PAC), especialmente em crianças menores de 2 anos, idosos acima de 65 anos e pessoas com doenças pré-existentes (SBPT, 2021).

A aderência dos patógenos ao epitélio respiratório é o primeiro passo para o desenvolvimento de doenças infecciosas, considerando que, na maioria das vezes, as infecções virais tornam o tecido mais suscetível a colonização bacteriana, e o *S.*

pneumoniae é o principal oportunista. *H. influenzae* e *Mycoplasma pneumoniae* são frequentemente os segundos patógenos mais comuns encontrados na PAC. É importante lembrar que entre 16% e 45% das infecções pneumocócicas são mistas, geralmente envolvendo uma bactéria atípica ou um vírus (BLASI, 2007).

1.3.2 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae (Hi) é outra bactéria comumente encontrada em coinfeção e infecções secundárias a infecção viral, e também foi associada à complicação da doença durante pandemias de influenza (BRUNDAGE, 2006).

Trata-se de um Gram-negativo, pleomórfico, ou seja, pode apresentar várias formas, como cocobacilos e bastonetes curtos. São imóveis, não formador de esporos, responsável por infecção do trato respiratório superior. É uma bactéria que atinge principalmente crianças, causando infecções que começam geralmente no nariz e na garganta, podendo se espalhar para outras partes do corpo. Essa bactéria pode causar diferentes doenças infecciosas com complicações graves, como a pneumonia, mas também pode viver na garganta das pessoas e, mesmo sem causar doença no portador, pode ser transmitida por via respiratória, por meio de tosse, espirros e respiração (VERONESI; FOCACCIA, 2015).

O nome *influenzae* foi descrito pela primeira vez por Richard Pfeiffer em 1892, de forma equivocada, após relacionar esse patógeno como responsável pela gripe comum durante um surto de gripe. Ele encontrou *H. influenzae* no escarro de pacientes e propôs uma associação causal entre esta bactéria e o quadro clínico da doença. Em 1920 o microrganismo recebeu a nome *Haemophilus* por Charles Edward Winslow e colaboradores. Posteriormente foi descoberto que o agente causador da gripe era o vírus influenza e que o *H. influenzae* era o responsável por infecções respiratórias secundárias (CDC, 2006).

A cápsula polissacarídea do *H. influenzae* é um fator de virulência importante, classificando, dessa forma, em tipável (capsulado) e não tipável (sem capsula). A forma não encapsulada frequentemente coloniza as membranas das mucosas e podem causar otite média aguda, sinusite, bronquite e pneumonia. Já a capsulada pode causar doenças invasivas, tais como meningite, bacteremia, epiglote, pneumonia, empiema e celulites. Apenas uma pequena proporção dos portadores

de *Hi* irá desenvolver a doença clínica, ainda assim, os que os carregam na nasofaringe são disseminadores importantes do organismo (VERONESI; FOCACCIA, 2015).

O efeito da coinfeção por *H. influenzae* versus infecção individual é notavelmente diferente. Geralmente, a coinfeção por este patógeno resulta em morbidade mais grave do que a infecção por *H. influenzae* isoladamente (MORRIS; CLEARY; CLARKE, 2007). Estudos realizados por Lee E.H *et al.*, 2010, mostrou que a coinfeção resultou em doença grave ou morte, enquanto que, por conta própria, *H. influenzae* e o vírus influenza induziram apenas infecção leve. No mesmo ano, um estudo semelhante forneceu resultados comparáveis e evidências de que a coinfeção por influenza e *H. influenzae* produz mais destruição de células epiteliais do que uma única infecção por qualquer um dos patógenos, o que foi semelhante ao observado em vítimas de pandemias de influenza (LEE L.N *et al.*, 2010).

1.3.3 *Mycoplasma pneumoniae*

Os micoplasmas compreendem os menores microrganismos de vida livre, totalmente desprovidos de parede celular. São pequenos procariontes que possuem apenas membrana plasmática e podem colonizar ou determinar doenças no homem, animais e plantas (VERONESI; FOCACCIA, 2015). Embora mais de 200 espécies de micoplasma tenham sido descobertas, o *Mycoplasma pneumoniae* (*Mp*) é o mais reconhecido entre elas, seja como patógeno principal ou oportunista (WAITES *et al.*, 2013).

A pneumonia causada pelo *M. pneumoniae* é um tipo de pneumonia bacteriana atípica, ou seja, tem uma apresentação incomum da doença. Essa definição foi dada devido às diferenças na apresentação clínica, como sintomas e duração deste, que são diferentes da pneumonia típica, porém, esses sintomas podem ser mais leves do que os apresentados na pneumonia comum, mas tendem a durar por mais tempo. O número de infecções por *Mp* varia ao longo do tempo, tendo picos endêmicos e epidêmicos de doença com ciclos a cada 3 a 7 anos e os surtos ocorrem principalmente em ambientes lotados, como universitárias e asilos (CDC, 2020).

As infecções mais importantes para o homem causadas por micoplasma atingem o trato respiratório, incluindo faringites, traqueobronquites e pneumonias, que ocorrem em cerca de 1/3 das pessoas infectadas, sendo disseminada através de gotículas eliminadas pela tosse ou espirro dos infectados, mas, os indivíduos também podem ter a bactéria no nariz ou na garganta sem estarem doentes. Pela ausência da parede celular, apresentam-se, após coloração, como Gram-negativos. Historicamente o primeiro representante do grupo, cultivado em 1898 da pleuropneumonia bovina, foi o *M. pneumoniae*, relacionado com a síndrome de pneumonia atípica do homem (VERONESI; FOCACCIA, 2015; CDC, 2020).

Como dito anteriormente, o *Mp* é uma causa comum de PAC, principalmente em crianças e jovens adultos, mas também exerce um importante papel em infecções de idosos, com elevados índices de hospitalização e mortalidade, já que em 15% dos casos de pneumonias em indivíduos com mais de 40 anos o agente etiológico é o micoplasma. Além disso, pode desenvolver uma série de manifestações extrapulmonares na ausência de pneumonia (VERONESI; FOCACCIA, 2015).

O envolvimento de outros patógenos durante a infecção por *Mycoplasma pneumoniae* tem sido amplamente discutido. Alguns estudos apontam para a necessidade de exames laboratoriais de rotina para a investigação de coinfeção por *M. pneumoniae* e outros patógenos comuns das infecções respiratórias em pacientes com Covid-19, sugerindo que estes agentes em infecções secundárias possam piorar quadros de doenças agudas (AVALOS *et al.*, 2020; GAYAM *et al.*, 2020).

1.4 Diagnóstico das infecções respiratórias agudas (IRA)

Considerando que um diagnóstico etiológico preciso é fundamental para adequar a terapêutica, conhecer o perfil das IRA causadas por diferentes agentes contribui para um uso mais racional de antimicrobianos no tratamento das pneumonias (ESPOSITO *et al.*, 2013).

O diagnóstico das infecções respiratórias inclui a avaliação dos sinais e sintomas, no entanto, esse diagnóstico pode ser dificultado, pois as manifestações clínicas da doença podem ser semelhantes, mesmo sendo causada por diferentes agentes, conseqüentemente, há dificuldades para a identificação do patógeno. Diante disso, deve-se utilizar ao menos um exame laboratorial para confirmação do

diagnóstico etiológico. Para isso, existem diversos exames que podem ser utilizados, prescritos conforme a suspeita do caso. A Tabela 1 lista os exames utilizados para detecção dos agentes em infecções respiratórias, de acordo com o Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2009).

Tabela 1. Exames para detecção dos agentes em infecções respiratórias

Radiológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Raio X de tórax
Sinais e Sintomas	<ul style="list-style-type: none"> • Febre (>38°C) sem outra causa. • Leucopenia ou leucocitose. • Aparecimento, mudança ou aumento da secreção pulmonar. • Aparecimento ou piora da tosse ou dispneia ou taquipneia • Estertores ou roncospresentes. • Piora da função respiratória.
Laboratoriais	<p>Pelo menos um dos seguintes critérios para pneumonia por bactérias ou fungos filamentosos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemocultura positiva não relacionada à outra fonte de infecção. • Cultura positiva de líquido pleural. • Cultura quantitativa positiva de secreção pulmonar. • Bacterioscopia. • Exame histopatológico. <p>• Para pneumonia por Vírus, <i>Legionella</i>, <i>Chlamydia</i>, <i>Mycoplasma</i> ou outros agentes etiológicos atípicos, inclui-se os exames sorológicos para detecção de antígenos ou anticorpo viral de secreção respiratória, como por exemplo ELISA, imunofluorescência, shell vial e PCR.</p>

Fonte: Ministério da saúde, 2009. Adaptado.

1.5 PCR em tempo real (qPCR)

Por serem definidas como doença de evolução rápida, as IRA têm se tornado um importante problema de saúde pública, sendo assim, o uso de métodos de identificação rápidos e sensíveis são essenciais. Nesse contexto, surgiram os testes

de amplificação de ácidos nucleicos, como o da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) que permite o monitoramento da amplificação durante a corrida através de sondas marcadas com fluorescência. Essas modificações tornam a qPCR um método mais sensível quando comparado à PCR convencional (MELO, 2006; FARAH, 2007).

A PCR se tornou um método muito utilizado, pois proporciona uma elevada sensibilidade e especificidade (REIS *et al.*, 2008). Essa técnica permite a detecção de quantidades mínimas de produto de PCR (DNA, cDNA ou RNA), fornecendo resultados rápidos. A partir desta metodologia, podemos detectar, em uma única reação, diferentes patógenos em uma mesma amostra clínica coletada de pacientes com suspeita de infecção respiratória. Para isso, diversos protocolos baseados na PCR têm sido desenvolvidos, demonstrando uma alta sensibilidade analítica e uma excelente linearidade (CONNEL, 2002; MARY *et al.*, 2004).

A PCR em tempo real ou qPCR, é uma tecnologia que possibilita o diagnóstico molecular, facilitando o monitoramento da reação à medida que ela progride (BUSTIN; MUELLER, 2005). Essa técnica vem sendo amplamente utilizada em estudos para o desenvolvimento de metodologias diagnósticas, uma vez que permite uma detecção e quantificação das amostras de forma rápida e precisa (KAMAU *et al.*, 2011). Devido às vantagens de utilização da técnica, o número de estudos reportando ensaios pela qPCR aumenta a cada ano (HAAS; TORRES, 2016; GALLUZZI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020).

O sistema Taqman, utiliza em conjunto um par de iniciadores e sondas fluorescentes para medir quantidades de ácido nucleico alvo. A amplificação de uma determinada região é acompanhada pela hibridização de uma sonda específica ao fragmento amplificado que, durante a fase de extensão do ciclo de PCR, emite fluorescência de acordo com o número de cópias amplificadas. Na medida em que ocorre a dissociação do corante repórter do supressor, ocorre o aumento na fluorescência, que é proporcional à quantidade de produto de PCR na reação. Dessa forma, podemos detectar o alvo de interesse, além de quantificar o fragmento (WATSON; LI B., 2005).

O sistema HRM (High Resolution Melting) é uma metodologia altamente sensível adicional à qPCR capaz de diferenciar sequências de DNA muito próximas, inclusive sequências que apresentam polimorfismos de base única (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) nas sequências dos genes-alvo. Funciona como um

método rápido de genotipagem de variantes conhecidas ou para a varredura de variantes desconhecidas, capaz de discriminar produtos específicos da PCR através da temperatura de melting (T_m). Essa diferenciação ocorre através da curva de melting, que é dada a partir da dissociação da fita dupla e dependente da concentração do conteúdo de GC e do tamanho do fragmento de DNA (GRAHAM *et al.*, 2005; REED; KENT; WITTEWER, 2007; DE SOUZA SANTOS *et al.*, 2022).

1.5.1 qPCR-HRM

Uma grande vantagem da qPCR-HRM é a diminuição do risco de erro ou contaminação, visto que não existem manipulações pós-PCR. A outra vantagem principal é que o HRM é mais econômico que o método da PCR em tempo Real Taqman, amplamente utilizado para quantificar e detectar fragmentos de DNA de diversos organismos e células humanas. No HRM, o sistema de detecção de alta resolução não apenas permite a determinação de homo e heterozigoto, mas também identifica as diferenças epigenéticas, dando origem a diferentes formas de curvas de dissociação, tornando-se adequado para testar um grande número de amostras (REED; KENT; WITTEWER, 2007; ROULEAU *et al.*, 2009). Por esse motivo, essas metodologias têm sido constantemente aprimoradas, auxiliando dessa forma na busca de mutações em genes de importância médica e na identificação molecular de espécies (ASHTIANI *et al.*, 2017; EDWARDS *et al.*, 2018).

1.6 Justificativa

Devido ao seu elevado potencial de propagação, as IRA estão associadas a um elevado número de óbitos em todo o mundo a cada ano, por serem agravos com alto potencial de contágio que ocorrem principalmente através da eliminação de perdigotos (gotículas contaminadas que podem ser liberadas através do espirro, bocejo ou pela da fala) por indivíduos portadores. A transmissão também pode ocorrer através do contato da mão com superfícies contaminadas, seguida da autocontaminação, constituindo uma importante via de transmissão da doença (WHO, 2014; VERONESI; FOCACCIA, 2015).

Algumas infecções respiratórias agudas com tendência a produção de epidemias podem representar uma emergência de saúde pública em nível global. Entre elas, podemos encontrar MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2 causando síndrome respiratória aguda grave, influenza causada por um novo subtipo e novas infecções respiratórias com potencial para causar surtos e aumento da mortalidade (OMS, 2005; 2020c).

A maioria dos patógenos respiratórios produzem, em hospedeiros, sintomas semelhantes, tornando difícil identificá-los clinicamente. Por esse motivo é de suma importância a utilização de diagnóstico diferencial capaz de identificar o agente causador da infecção. Por sua sensibilidade e especificidade, os testes moleculares como a qPCR, estão sendo usados para amplificação simultânea de vários patógenos em uma mistura de reação única, o que os torna rápidos e econômicos (MALHOTRA *et al.*, 2016).

Apesar de sua vasta aplicabilidade, não existe um protocolo único que seja apropriado para todas as situações. Ao longo dos anos, diversos estudos têm sido desenvolvidos para permitir a detecção dos patógenos. A melhoria nos protocolos de diagnóstico tem contribuído para que a tecnologia da PCR em tempo real seja hoje a tecnologia de referência para a detecção de DNA microbiano (OLIVEIRA, 2010; LI *et al.*, 2020).

A pandemia de Covid-19 gerou grandes impactos, principalmente no sistema de saúde pública, aumentando a necessidade de implementação de medidas de prevenção da transmissão e controle sanitário da doença, logo, a correta identificação do patógeno é de extrema importância para a avaliação e monitoramento pelos órgãos de saúde envolvidos, mantendo dessa forma um maior controle epidemiológico dos casos (BIGONI *et al.*, 2022).

Desse modo, a implantação de uma técnica para o diagnóstico das infecções respiratórias que permita diferenciar os patógenos com rapidez e sensibilidade é fundamental para um tratamento mais adequado com melhor prognóstico para os pacientes. As análises moleculares portanto, se tornaram essenciais, já que permitem um melhor entendimento dos processos evolutivos de doenças. Nesse contexto, a proposta desse estudo foi identificar a presença de patógenos bacterianos em pacientes apresentando IRA com suspeita de Covid-19. Para o diagnóstico diferencial utilizamos o método da qPCR-HRM, diminuindo os custos da

reação, mantendo a mesma sensibilidade e especificidade do método Taqman tradicionalmente utilizado como padrão-ouro para diagnóstico. Vale ressaltar a relevância deste estudo para a vigilância sanitária, visto que os resultados obtidos permitirão uma análise comparativa e complementar a outras abordagens científicas sobre a doença, auxiliando na implementação de estratégias que podem reduzir novos surtos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolvimento e otimização de um método de detecção simultânea de *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* em infecções respiratórias agudas de pacientes diagnosticados como positivos ou negativos para Covid-19, por qPCR com High Resolution Melting (HRM).

2.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae* e *H. Influenzae* por qPCR-HRM em reações individuais (singleplex);
- Otimizar a pesquisa de *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae* e *H. Influenzae* por qPCR-HRM em reação simultânea (multiplex);
- Avaliar a ocorrência de *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* em material clínico de pacientes com resultados positivo ou negativo para Covid-19;
- Avaliar a possível associação dessas bactérias em amostras positivas para Covid-19 com a gravidade do quadro clínico.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostras controle

Foram utilizadas cepas de referência como controle para a determinação das Temperaturas de Dissociação ou Temperatura de *Melting* (T_m) específicas. As cepas de referência fazem parte da Coleção de Bactérias Patogênicas – CBP do INCQS/FIOCRUZ e foram preservadas por liofilização em ampolas de vidro seladas à vácuo e mantidas a -20°C . A Tabela 2 lista todas as cepas de controle utilizadas no estudo. Os isolados foram identificados através da qPCR-HRM de genes utilizados para o diagnóstico dos agentes etiológicos.

Tabela 2. Microrganismos de referência utilizados no estudo.

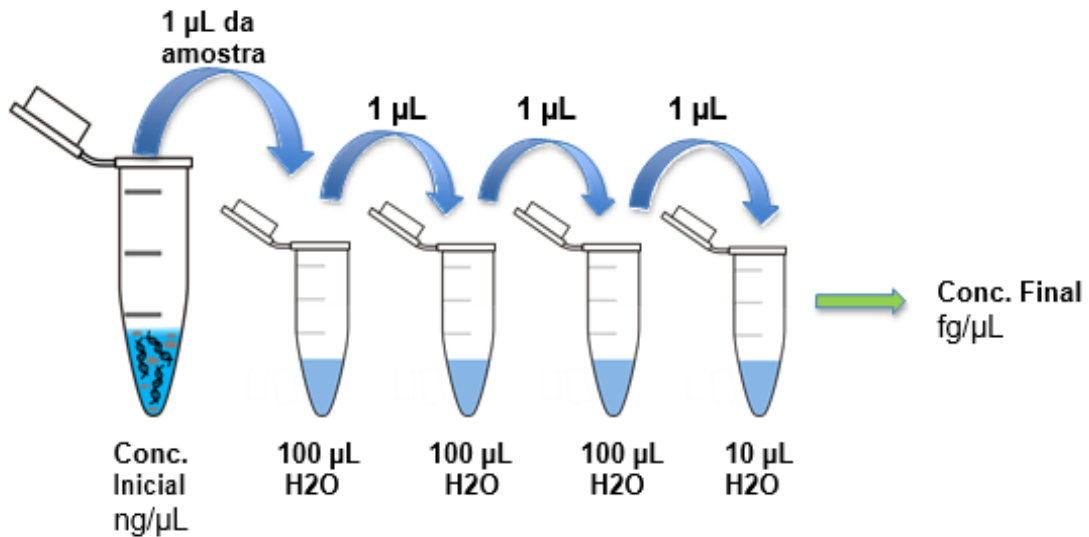
Microrganismo	Origem
<i>Haemophilus influenzae</i>	INCQS 00200 (ATCC 33533)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	INCQS 00360 (ATCC 33400)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	INCQS 00669 (UFF/ATCC 15492)

O DNA genômico dessas cepas foi extraído e purificado no Laboratório de Microrganismos de Referência LMR do INCQS. A ampola liofilizada foi reconstituída com 0,5 ml em Caldo Tripticaseína Soja -TSB conforme descrito no POP 65.3220.019 para a abertura de ampolas e manutenção de microrganismos de referência. A partir do crescimento microbiano obtido foi realizado a extração e purificação de DNA genômico utilizando-se o protocolo do kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit para Gram positivos e negativos de acordo com as instruções do fabricante. O DNA genômico foi purificado utilizando o mesmo kit e foi armazenado a -20°C no LMR-INCQS.

Também foi realizada a quantificação do DNA utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop® 2000 Thermo Scientific®*. Após a dosagem, foi realizada uma diluição seriada, conforme mostra a Figura 1, das cepas de referência para a determinação

do limite de detecção (LOD) do DNA.

Figura 1. Preparo da diluição seriada



3.2 Seleção das amostras clínicas

Não houve manipulação de material clínico de pacientes com suspeita de Covid-19 no INCQS. As amostras clínicas foram cedidas pela Central Analítica de Apoio ao Diagnóstico de Covid-19 da plataforma NB3 do IOC/FIOCRUZ onde foram submetidas à extração e purificação de ácidos nucleicos (RNA e DNA) para as análises de diagnóstico de Covid-19. Uma alíquota das amostras purificadas foi enviada ao LMR-INCQS para utilização no projeto aqui apresentado.

Foram selecionadas um total de 354 amostras clínicas (de swab orofaríngeo) previamente classificadas como positivas e negativas para SARS-Cov-2, de pacientes que deram entrada com suspeita de Covid-19 e foram posteriormente confirmados por RT-PCR real time, no período de abril de 2020 a dezembro de 2021. A presença do vírus SARS-Cov-2 nas amostras dos pacientes, foi detectada pelo método padrão-ouro de qPCR-Taqman na plataforma NB3 do IOC/FIOCRUZ. A seleção foi feita através do banco de dados do sistema GAL (Gerenciador de ambiente laboratorial do Ministério da Saúde).

3.3 Dados demográficos e critérios de inclusão e exclusão

Foi desenvolvido um pequeno banco de dados com informações dos pacientes como idade e sexo. A caracterização do quadro clínico é importante, pois foi avaliada nas considerações finais. O quadro clínico foi classificado conforme mostrado na Tabela 3.

Como critério de inclusão/exclusão foi considerado o resultado da qPCR (Taqman) obtido nas análises da Central Analítica. Amostras com valor de Ct ≤ 35 eram consideradas positivas e >35 negativas. Esse foi o critério utilizado pela plataforma NB3 do IOC/FIOCRUZ para o diagnóstico.

Tabela 3. Classificação dos casos conforme os sintomas relacionados à Covid-19.

Quadro Clínico	Sintomas
Assintomático	Ausência de sintomas, porém, positivo para Covid-19 por RT-qPCR.
Leve	Tosse, dor de garganta, coriza, perda ou não de olfato e paladar, diarreia, dor abdominal, febre, calafrios, mialgia, fadiga e/ou cefaleia.
Moderado	Persistência sinais leves ou até de piora progressiva de outro sintoma relacionado à Covid-19 (adinamia, hiporexia), além da presença de pneumonia sem sintomas de gravidade.
Grave	SRAG – apresentando dispneia/desconforto respiratório baixa saturação de O ₂ ou coloração azulada de lábios ou rosto.
Crítico	Sepse, síndrome do desconforto respiratório agudo, insuficiência respiratória grave, disfunção de múltiplos órgãos, pneumoniagrave, necessidade de suporte respiratório e internação em UTI.

Fonte: Ministério da Saúde, 2021. Adaptado. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/sintomas>. Acesso em: 10 mar. 2022.

Legenda: RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa; SRAG: Síndrome Respiratória Aguda Grave

3.4 Detecção dos patógenos bacterianos

Inicialmente foram utilizados dois termocicladores para a amplificação das reações por qPCR-HRM, o termociclador *Rotor-Gene Q 5-plex HRM* (RG) da *Qiagene*

e o *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (QS7)* da *Thermo Fisher*, no Departamento de Microbiologia do INCQS. Para a visualização dos resultados e análises dos parâmetros das reações, foi utilizado o software HRM do próprio equipamento. A fim de determinar o fluoróforo que fornecia o melhor resultado, foi testado inicialmente o fluoróforo Evagreen (5x hot FIREpol® Evagreen® HRM Mix – SolisBiodyne). Posteriormente testamos o fluoróforo Syto9 (MeltDoctor™ HRM Master Mix) que é o kit indicado pelo fabricante do equipamento (QS7). Esse teste foi realizado com as cepas de referência listadas na Tabela 2.

Para o termociclador RG, foi utilizado o Master Mix da SOLIS Biodyne, no entanto, os resultados obtidos nesse aparelho foram muito instáveis nas repetições e inconclusivos. Para a reação realizada no QS7 foi utilizado o MasterMix MeltDoctor indicado pela ThermoFisher para realização de experimentos de HRM nesse termociclador. Os resultados com o MasterMix MeltDoctor no QS7 apresentaram maior estabilidade nas repetições, portanto, passamos a utilizar esse reagente.

3.5 Protocolo de reação

A reação foi realizada conforme as especificações do fabricante (Tabela 4), composta de 1X MasterMix; iniciadores *forward* e *reverse* (Tabela 5); DNA molde e água para PCR Gibco®, *DNase/RNase* livre, completando o volume final. Para o corante *Evagreen* da SOLIS no RG, foi utilizado um volume final de 20 µL e para o *MeltDoctor*, no QS7 o volume final foi de 10 µL. As condições da reação foram: 1 ciclo a 95°C por 5', 40 ciclos a 95°C por 10", 60°C por 30", 72°C por 10" para o QS7. Quanto as reações realizadas no RG, as condições foram: 1 ciclo a 95°C por 15', 40 ciclos a 95°C por 15", 60°C por 30", 72°C por 10". Após a PCR, iniciou-se a etapa de HRM para a obtenção da (T_m), iniciando em 65°C, aumentando 0,1°C a cada 2 segundos até atingir a temperatura de 95°C. Nessa etapa as fitas de DNA são abertas para a leitura da fluorescência, formando a curva de dissociação que vai determinar a T_m .

O primer inicialmente usado para detecção de *M. Pneumoniae*, (GPO-1/MSGO) descrito por Van Kupperveld (1992), não é específico para a espécie, podendo detectar outros *Mycoplasmas spp.* Portanto novos primers foram utilizados, (M1, M2 e M3), conforme descrito por Russjan, 2021. Após os testes, foi escolhido o

iniciar M3 para a detecção do *M. pneumoniae* por apresentar a temperatura de Melting mais distinta das apresentadas na detecção das outras bactérias do estudo. Para a detecção de *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, foram utilizados os iniciadores *ply* e *p6*, respectivamente, já descritos na literatura (de FILIPPIS *et al.*, 2016). Todos os primers utilizados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 4: Protocolo das reações utilizando dois tipos de fluoróforos no termociclador QS7.

Reagentes	Volume para 1x reação <i>Meltdoctor (Applied Biosystems)</i>	Volume para 1x reação <i>Evagreen (Solis)</i>
Master Mix	5,0 µL	2,0 µL
Primer F	0,6 µL	0,4 µL
Primer R	0,6 µL	0,4 µL
DNA	1,0 µL	1,0 µL
Água	2,8 µL	6,2 µL
Volume Total	10,0 µL	10,0 µL

Nota: Para as reações realizadas no termociclador *RotorGene* o volume dos reagentes foi dobrado e o de água ajustado para completar o volume da reação em 20,0 µL

Tabela 5. Iniciadores utilizados para a amplificação pela qPCR-HRM.

Microrganismo	Primer	Sequência
<i>M. pneumoniae</i>	GPO-1	F- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
	MSGO	R- TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC
	M1	F- GCAGGTAATGGCTAGAGTTT R- TGCCTTTAACACCAGACTTT
<i>M. pneumoniae</i>	M2	F- TGACTTTAGCAGGTAATGGC R- ACACCAGACTTTTCAATCCG
	M3	F- TTATTTGGGAAGAATGACT R- TTGCGACCTATGTATTAC
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>ply</i>
<i>H. influenzae</i>	<i>p6</i>	F- GAAGGTAATACTGATGAACG R- TCACCGTAAGATACTGTG

3.6 Confirmação da identificação

Para a confirmação dos resultados encontrados através da análise do HRM, foi realizado o sequenciamento *Sanger* de 27 amostras. Para tal, foi realizada uma reação de PCR convencional com o kit GoTaq Master Mix – Promega. Após confirmação da amplificação pela visualização da banda em gel de agarose, os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit de purificação de produto de PCR PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit de acordo com o manual do fabricante e, em seguida, quantificados por espectrofotometria no Espectrofotômetro NanoDrop 2000c (*Thermo Scientific*). Os produtos purificados foram então submetidos à reação de sequenciamento utilizando os mesmos primers usados na 1ª reação e o kit *Big Dye Terminator* (LIFE TECHNOLOGIES). Os fragmentos amplificados na reação de sequenciamento foram precipitados seguindo o protocolo de sequenciamento de DNA *Sanger*, da plataforma SeqStudio, com diversas lavagens, centrifugações e precipitação final do DNA. O sequenciamento dos fragmentos amplificados foi realizado por eletroforese capilar no sequenciador de DNA *SeqStudio* (*Applied Biosystems*) no Departamento de Microbiologia do INCQS. A análise da qualidade das sequências e a montagem do arquivo *fasta* foi realizada com o programa *Sequencher* 5.0 e os alinhamentos para comparação com sequências de referência, foram realizados com o programa *Bioedit* 7.0. As sequências obtidas foram analisadas com a ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool* – <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para alinhamento e confirmação das espécies bacterianas encontradas.

3.7 Associação da detecção de bactérias com a gravidade do quadro clínico

Para avaliação da possível associação de bactérias em amostras positivas com a gravidade do quadro clínico, consideramos o valor do Ct (Cycle Threshold) obtidos na qPCR-Taqman das amostras positivas para Covid-19 que permite a quantificação relativa do DNA de cada uma das amostras, observamos a presença de bactérias confirmada por qPCR-HRM e associamos com os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes na ficha de cadastro.

3.8 Análise estatística

Para avaliar se houve diferença entre os pacientes leves/moderados e graves/críticos para a presença de bactérias, tanto para positivos quanto negativos para Covid-19, foi realizado o Teste Z para comparação de duas proporções, com nível de significância menor que 0,05. O teste foi realizado no software R-Studio.

3.9 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado no CONEP-FIOCRUZ em 11/07/2022 sob o número CAEE 55577622.8.0000.5248.

4 RESULTADOS

4.1 qPCR-HRM

Foi verificado que apesar dos resultados obtidos variarem de acordo com cada kit de MasterMix, esses apresentam similaridade. Optamos por usar o kit para HRM *MeltDoctor™ HRM Master Mix* por apresentar resultados mais estáveis nas repetições. Desse modo, as temperaturas de melting (T_m) das cepas de referência foram determinadas conforme indicado na Tabela 6.

Também foram realizados testes para definir qual seria a melhor temperatura de anelamento. Foram avaliadas as temperaturas de 50°C a 60°C. Como não houve diferença significativa, ficou determinada a temperatura de anelamento de 60°C para todos os genes testados.

Tabela 6. Temperatura de *Melting* (T_m) das cepas controles, obtidas por qPCR-HRM.

Cepas de referência	T_m
<i>Haemophilus influenzae</i>	77,5°C – 78,5°C
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	75,6°C – 76,6°C
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	80,0°C – 81,0°C

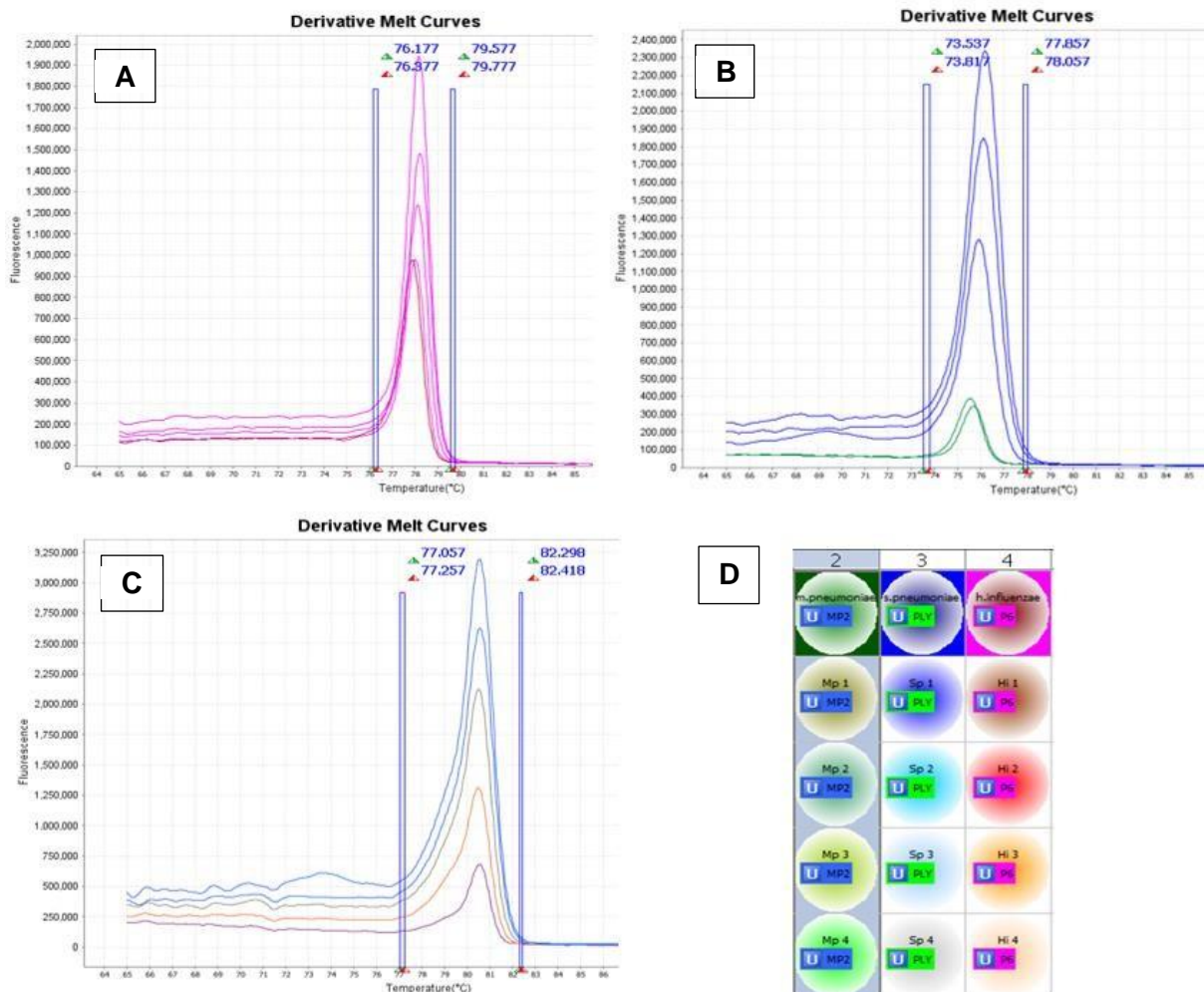
Nota: A faixa das T_m indicadas, foi obtida considerando $\pm 0,5^\circ\text{C}$ à média das T_m aferidas nas repetições com as cepas controle.

4.2 Limite de detecção – LOD (*Limit of Detection*)

Após a extração e purificação do DNA genômico das cepas de referência, foi realizada a dosagem do DNA utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop*. Para determinar o limite de detecção de DNA, foi realizada uma diluição seriada a partir do material dosado (TABELA 7), e posteriormente realizamos a qPCR-HRM (FIGURA 2). Conforme mostra a figura, a concentração do DNA não interfere na T_m das amostras na reação de HRM. O que ocorre é a variação na curva de dissociação. Então, quanto maior a concentração de DNA, maior a amplitude da curva de dissociação.

Tabela 7. Dosagem inicial e após diluição do DNA das cepas de referência utilizadas

MICROORGANISMO	DILUIÇÕES				
	Inicial	1:10 ²	1:10 ⁴	1:10 ⁶	1:10 ⁷
<i>M. pneumoniae</i>	68ng/μL	680pg/μL	6,8pg/ μL	68 fg/μL	6,8fg/μL
<i>S. pneumoniae</i>	49ng/μL	490pg/μL	4,9pg/μL	49fg/μL	4,9fg/μL
<i>H. influenzae</i>	12ng/μL	120pg/μL	1,2pg/μL	12fg/μL	1,2fg/μL

Figura 2. Curva de *melting* das cepas de referência após diluição para determinação do LOD.

Nota: **A:** curva de *melting* do gene *P6* com a cepa de referência Hi200 (*H. influenzae*); **B:** curva de *melting* do gene *Ply* com a cepa de referência Sp360 (*S. pneumoniae*); **C:** curva de *melting* do gene *16S – M3* com a cepa de referência Mp669 (*M. Pneumonie*). **D:** identificação das amostras.

4.3 Confirmação da identificação

Para a confirmação dos resultados encontrados através da análise do HRM, foi realizado o Sequenciamento *Sanger*, com os iniciadores listados na Tabela 5.

Tabela 8. Confirmação dos resultados obtidos por HRM, por sequenciamento de *Sanger*.

Identificação das amostras	HRM	<i>Sanger</i>
12*	77,933/ 77,954	96% Hh
56	77,855/ 77,845	98% Hi
65	77,864/ 77,834	95% Hi
103	78,521/78,471	99% Hi
104	78,439/78,439	97,5% Hi
107*	78,172/78,421	96% Hh
109	78,051/77,993	95,7% Hi
121	77,925/77,815	97,8% Hi
136*	78,035/77,925	91,5% Hh
149*	78,103/77,943	95% Hh
150*	77,950/ 77,994	96,6% Hh
151	78,132/78,122	96,5 Hi
152	77,834/ 77,874	96,9 Hi
166	78,088	94% Hi

18	76,105/76,105	88% Sp
21	76,383/76,175	89% Sp
36	75,987/75,787	91% Sp
39	75,538/75,599	90% Sp
49	76,008/75,993	93% Sp
50	75,759/75,787	90,2% Sp
52	75,827/75,798	95,2% Sp
53	76,047/75,947	92% Sp
26	80,426/80,316	97% Mp
27	80,395/80,445	94% Mp
32	80,377/80,316	100%Mp
34	80,634/80,623	91% Mp
35	80,584/80,505	90%Mp

Legenda: As amostras marcadas com (*) são amostras positivas para *Haemophilus influenzae* (Hi) por HRM e identificadas como *Haemophilus haemolyticus* (Hh) pelo sequenciamento; Sp = *Streptococcus pneumoniae*; Mp = *Mycoplasma pneumoniae*; HRM: High Resolution Melting. Todas as amostras listadas acima, foram coletadas de pacientes com diagnóstico para Covid-19.

4.4 Resultados da qPCR-HRM/Singleplex

Foram realizadas reações nos termocicladores Rotor Gene e QS7. Todos os testes foram repetidos, no mínimo, 2 vezes para a confirmação do resultado encontrado, totalizando aproximadamente 358 reações com o reagente da Solis Biodyne, sendo 48 reações no RG e 310 no QS7. Desse modo, concluímos que por

apresentar maior estabilidade entre as repetições das reações, optamos por usar apenas o termociclador QS7, onde foram realizadas mais de 2150 reações com o MasterMix MeltDoctor, uma vez que cada amostra foi testada, pelo menos, duas vezes para cada microrganismo. Todas as reações foram individuais (singleplex).

Após a comparação entre os resultados obtidos através da qPCR-HRM, verificamos que foram encontrados um grande número de amostras positivas para os diferentes microrganismos testados, conforme mostra a Tabela 8. Com esses resultados, a metodologia utilizada mostrou alta sensibilidade, permitindo determinar a Tm das cepas utilizadas no estudo por qPCR-HRM.

Os resultados descritos na Tabela 9 mostram um total de 129 cepas de bactérias detectadas nas amostras positivas para Covid-19 e 86 nas negativas para Covid-19. Considerando que algumas amostras testaram positivo para mais de um patógeno bacteriano, além do vírus da Covid-19, o que foi confirmado pelo sequenciamento de *Sanger*, o número correto de amostras clínicas com detecção de pelo menos um patógeno bacteriano, nos dois conjuntos de amostras clínicas (Covid-19 positivas e negativas), foi de 87 (52,4%) e 70 (37,2%) respectivamente, o que dá um total de 157 amostras com pelo menos 1 patógeno bacteriano, que corresponde a 44,3% do total de amostras analisadas. Foi ainda possível detectar dois patógenos bacterianos em 51 amostras, sendo 35 (21%) entre as amostras Covid-19 positivas e 16 (8,5%) entre as negativas.

Tabela 9: Resultados obtidos pela qPCR-HRM no QS7

Número de amostras testadas	Identificação dos patógenos pela qPCR-HRM		
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>M. pneumoniae</i>
166 amostras positivas para Covid-19	68 (40,1%)	40 (24,1%)	21 (12,6%)
188 amostras negativas para Covid-19	43 (22,8%)	37 (19,6%)	6 (3,2%)

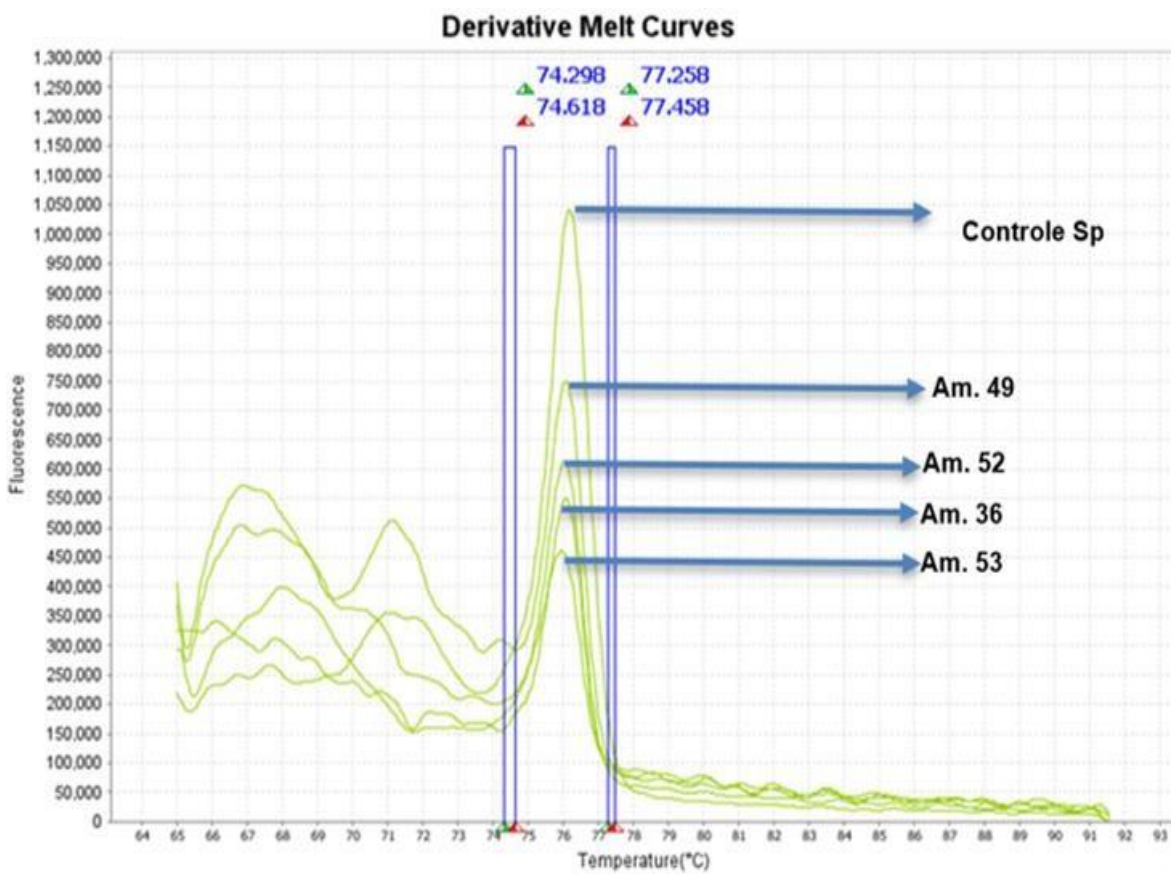
Nota: amostras clínicas cedidas pela Central Analítica de Apoio ao Diagnóstico de Covid-19 do IOC.

4.4.1 qPCR-HRM Multiplex

Ao final das análises, realizamos a otimização da detecção por qPCR-HRM em reação simultânea (multiplex).

Foi realizada a qPCR multiplex de 4 amostras que testaram positivo para o *S. pneumoniae* pelo HRM – Singleplex (Figura 3). A metodologia permitiu detectar e confirmar os resultados já obtidos nas reações individuais.

Figura 3. Curva de *melting* do gene *ply* em reação de qPCR- HRM multiplex

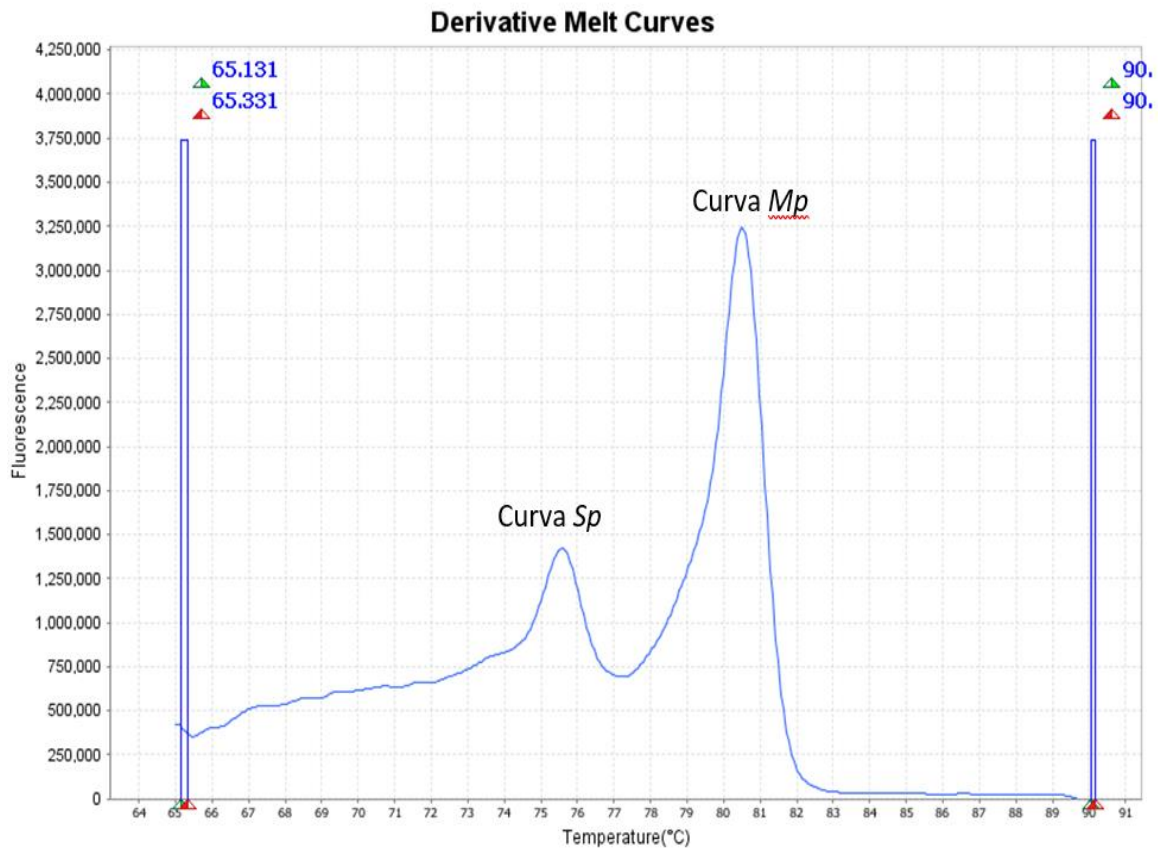


Legenda: Am: amostra; Sp: *S.pneumoniae*

Nota: amostras que testaram positivo para *S.pneumoniae* por qPCR-HRM singleplex e confirmada por sequenciamento, confirmadas em reação multiplex.

Foram também avaliadas duas cepas de referência de Mp e Sp por qPCR-HRM Multiplex para verificar a capacidade do método de detecção simultânea dos patógenos caso haja a presença de mais de um patógeno na mesma amostra clínica. (Figura 4).

Figura 4. Curva de *melting* das cepas de referência em reação multiplex



Nota: curva de *melting* do gene *ply* (*Sp*) e *16S-M3* (*Mp*) em reação multiplex.

4.5 Associação das amostras positivas para um patógeno bacteriano, com a gravidade do quadro clínico.

A análise da associação da presença de patógenos bacterianos em amostras positivas para Covid-19 com a gravidade do quadro clínico mostrou resultados importantes. Entre 166 amostras classificadas como Covid-19 positivas, em 87 foram detectadas pelo menos um patógeno bacteriano, 48 (55,2%) foram obtidas de pacientes com quadro considerado grave. Entre as 188 amostras classificadas como Covid-19 negativas, em 70 pelo menos um patógeno bacteriano foi detectado, sendo que 41 (58,6%) foram obtidas de pacientes com quadro de saúde grave.

É importante ressaltar que todas as amostras que testaram positivo para alguma das bactérias do estudo, foram obtidas de pacientes que apresentaram pelo menos um sintoma respiratório, lembrando que, dentre as amostras selecionadas, havia também pacientes assintomáticos.

Tabela 10. Presença de bactérias em amostras positivas e negativas para Covid-19

Número positivas pelo HRM	Sintomas		p-valor*
	Leves/ Moderados	Graves/ Críticos	
87 das 166 amostras positivas para Covid-19	39 (44,8%)	48 (55,2%)	0,16
70 das 188 amostras negativas para Covid-19	29 (41,4)	41 (58,6%)	0,35

Nota: P-valor do teste Z de comparação de duas proporções

Foi observado que aproximadamente 55,2% das amostras com resultado positivo para Covid-19, foram oriundas de pacientes com quadro grave ou crítico de síndrome respiratória aguda, apresentando um ou mais sintomas como: dispneia/desconforto respiratório, baixa saturação de oxigênio, sepse, síndrome do desconforto respiratório agudo, insuficiência respiratória grave, disfunção de múltiplos órgãos, pneumonia grave, necessidade de suporte respiratório e internada em UTI. O restante (44,8%) foi de pacientes apresentando sintomas moderados e/ou leves, como tosse, dor de garganta, coriza, anosmia e/ou hipogeusia, febre, calafrios, mialgia, fadiga, cefaleia, pacientes com persistência de sinais ou até de piora progressiva de outro sintoma relacionado à Covid-19 (adinamia, hiporexia), além de pneumonia sem sintomas de gravidade, conforme a classificação dada pelo Ministério da Saúde, mas sempre acompanhado por um ou mais sintomas respiratórios.

É importante destacar que entre os pacientes de quem foi colhido o material para análise, um foi registrado no GAL como óbito por SRAG e nesse paciente foi detectado *S. pneumoniae* por qPCR-HRM. Ainda, dos 15 pacientes diagnosticados com SRAG (menos o paciente com óbito), em dois foi detectado *M. pneumoniae* e em um *S. pneumoniae*.

5. DISCUSSÃO

O vírus SARS-CoV-2 recentemente associado à pandemia de Covid-19, causa uma doença respiratória aguda que pode ou não apresentar sintomas que clinicamente podem ser divididos em casos assintomáticos, leves, moderados, graves ou críticos, levando em consideração as manifestações clínicas. Ainda assim, não existe nenhum sintoma que seja exclusivo da doença, isso faz com que o prognóstico seja difícil, já que cada paciente pode apresentar um quadro clínico diferente, mesmo aqueles pacientes que apresentam os mesmos sintomas. Em alguns casos a doença pode ser fatal, o que pode estar associado a várias complicações, pois, já se sabe que indivíduos com comorbidades pré-existentes tem maior predisposição a desenvolver o quadro grave da doença (WHO, 2020a).

Apesar de controlada, a pandemia de Covid-19 ainda está causando mortes pelo país. Segundo dados do Painel Coronavírus, no mês de novembro de 2022, a média móvel de óbitos pela doença indicava tendência de alta em comparação ao mes anterior, chegando a mais de 70 óbitos diários (BRASIL, 2022b).

As infecções bacterianas são complicações comuns da pneumonia viral. Algumas complicações podem estar relacionadas com coinfeção ou infecção bacteriana secundária, que podem ser potencializadas pelo processo patológico desencadeado pela infecção por vírus. A infecção viral auxilia a infecção bacteriana de várias maneiras. Ao sobrecarregar o sistema imune, facilita a disseminação de bactérias e o desenvolvimento de infecções invasivas favorecendo a adesão, causando destruição de células e tecidos, especialmente em combinação com bactérias em infecções do trato respiratório de pacientes hospitalizados. Esse sinergismo vem sendo relatado ao longo dos anos em diversos estudos sobre epidemias e pandemias de Influenza e agora em estudos sobre complicações durante a pandemia do SARS-CoV-2 (MIKUSOVÁ *et al.*, 2022).

Diversos estudos apontam para o aumento da gravidade dos casos após uma infecção bacteriana (MORRIS *et al.*, 2017; TIMBROOK; MATIZ; GINOCCHIO, 2021; MIKUSOVÁ *et al.*, 2022). Um estudo realizado por Falsey e colaboradores (2013), mostrou que 40% das hospitalizações associadas a vírus têm evidência de infecção bacteriana secundária e, conseqüentemente, o aumento da gravidade da doença. Entretanto, no estudo de Bastian *et al* (2021), comparando o número de coinfeções

bacterianas, as taxas foram muito inferiores (cerca de 5%), embora as características clínicas dos pacientes fossem semelhantes. Possivelmente, isso pode ser atribuído ao uso de antibióticos de amplo espectro no tratamento da Covid-19, no entanto, quanto aos patógenos, as coinfeções bacterianas em pacientes com Covid-19 foram semelhantes às de outros vírus, como o da influenza.

Outros estudos fazem a associação da gravidade da infecção viral com a coinfeção bacteriana em pacientes com Covid-19, associada a um risco aumentado de mortalidade hospitalar, atingindo uma média de mais de 50% de óbitos. Embora a taxa de coinfeção nesses estudos tenham sido baixas em pacientes infectados por SARS-CoV-2, todos presumem a coinfeção como fator de risco para pacientes em internação. As características clínicas que definem a coinfeção bacteriana foram variadas e dependentes da apresentação clínica do paciente (NETO *et al.*, 2020; SHARIFIPOUR *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020; KARAASLAN *et al.*, 2021).

Dois estudos de revisão e meta-análise sobre a coinfeção em pacientes positivos para SARS-CoV-2 detectaram bactérias típicas como, *H.influenzae* e *S.pneumoniae*, entre outras, e bactérias atípicas como o *M.pneumoniae*, em pacientes críticos na UTI com Covid-19 (LANSBURY *et al.*, 2020; TIMBROOK; MATIZ; GINOCCHIO, 2021). Lansbury e colaboradores (2020) citam que, em seus achados, as bactérias mais comumente associadas à infecção por influenza são aquelas que comumente colonizam a nasofaringe, como *Streptococcus pneumoniae*. Outros patógenos mais comumente detectados foram *Mycoplasma pneumoniae*, seguido por *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Klebsiella pneumoniae*. Também, associaram as coinfeções bacterianas ao aumento da mortalidade e maior proporção de pacientes críticos com Covid-19 em ambiente hospitalar, assim como foi visto em epidemias e pandemias passadas. Esses achados são semelhantes aos estudos que relatam bactérias implicadas em infecções secundárias. Como esperado, em nosso estudo o *S. pneumoniae* foi o patógeno mais detectado com 31,3% de amostras positivas entre os dois grupos de amostras positivas e negativas para Covid-19, seguido do *H. Influenzae* com 21,7% de amostras positivas e do *M. pneumoniae* com 7,6% de amostras positivas. Considerando amostras onde foi detectado apenas um patógeno bacteriano, temos um total de 157 amostras positivas (44,3%).

Os resultados apresentados em nosso estudo, também apontam para uma possível piora do desfecho clínico e aumento da gravidade da doença pela

associação entre bactérias e o SARS-Cov-2. Nossos resultados sugerem que a associação do vírus da Covid-19 com patógenos comuns em infecções respiratórias, seja responsável pela gravidade dos casos das amostras analisadas, visto que, em mais de 50% das amostras de pacientes diagnosticados com Covid-19 e classificados com quadro grave ou crítico de acordo com a classificação do MS, foram detectados um ou mais patógenos bacterianos do material utilizado para o diagnóstico viral, incluindo pacientes que vieram a óbito.

Outra observação importante foi que, entre as amostras avaliadas, foi encontrado um número maior de amostras positivas para algum dos patógenos bacterianos em pacientes com infecção confirmada para o SARS-CoV-2, do que em amostras negativas para o vírus. Esta observação aponta para casos de pandemias passadas já descritas na literatura, onde é descrito que a infecção viral pode favorecer a aderência de outros patógenos, levando ao aumento da gravidade de infecções respiratórias (ALVIM; LASMAR, 2009; JOSEPH; TOGAWA; SHINDO, 2013).

Apesar da confirmação da presença de patógenos bacterianos em mais da metade das amostras de pacientes diagnosticados com Covid-19 e quadro grave ou crítico, não é possível afirmar qual o papel desses patógenos na gravidade do quadro, mas esse achado sugere fortemente que esses microrganismos podem ter contribuído de forma decisiva para o agravamento do quadro de saúde. A associação das patologias desses agentes em conjunto com os danos causados pela Covid-19, podem com certeza terem sido as causas do agravamento do quadro e da evolução para o óbito em alguns pacientes apesar de não termos os números dos desfechos para cada caso.

Podemos considerar que o resultado mais importante desse estudo foi a possibilidade de detecção de patógenos bacterianos em pacientes com sintomas de Covid-19 por qPCR-HRM. Essa técnica que apresenta a mesma sensibilidade que a qPCR-Taqman, tem menor custo por não utilizar sondas e poderia ser usada junto com o método de diagnóstico viral para esses casos. Dessa forma os profissionais de saúde estariam cientes da presença de algum patógeno bacteriano no material colhido do paciente e o tratamento poderia ser mais efetivo com um melhor prognóstico.

As amostras clínicas nas quais foram detectados patógenos bacterianos pela qPCR-HRM foram submetidas ao sequenciamento dos genes amplificados na

reação de diagnóstico. Assim, um resultado interessante foi que, ao sequenciar as amostras que testaram positivo para *Haemophilus influenzae* para a confirmação dos resultados, observamos que se tratavam na verdade de cepas de *Haemophilus haemolyticus*, conforme foi mostrado na Tabela 8. Um estudo realizado por Murphy *et al.* (2007) mostrou que os métodos padrão não distinguem de forma confiável o *H. haemolyticus* do *H. influenzae*, pois, foi visto que a proteína P6 é compartilhada entre essas duas espécies. Outro estudo, em comparação com o de Murphy, mostrou que a caracterização molecular da proteína P6 da membrana externa, pode não diferenciar todas as cepas de *H. Influenzae* de *H. haemolyticus*, mas que podem ser distinguidas de forma confiável com base em sequenciamento de outros alvos (CHANG *et al.*, 2010).

Os vírus podem facilitar a fixação e colonização das bactérias no trato respiratório, o que certamente não é exceção para o Covid-19. No entanto, ainda há necessidade de maiores estudos para entender melhor os mecanismos das interações entre vírus e bactérias.

Os resultados encontrados através da análise das temperaturas das curvas de Melting geradas por HRM são promissores. Eles sugerem que a qPCR-HRM pode ser utilizada como um método de identificação e detecção de outros patógenos em amostras de Covid-19 de forma rápida e segura e representar uma alternativa a ser utilizada na rotina laboratorial.

Portanto, a metodologia aqui proposta, uma vez implementada, poderia trazer algumas vantagens significativas como o baixo custo e, principalmente, o tempo necessário para a identificação dos patógenos, contribuindo assim para o monitoramento epidemiológico mais efetivo da doença. Com isso, as autoridades de saúde poderiam ser informadas mais rapidamente sobre os casos e, desse modo, auxiliar no controle de casos e possíveis novos surtos de Covid-19 através do direcionamento das ações de vigilância em saúde a serem tomadas.

6 CONCLUSÕES

- O patógeno mais detectado no presente estudo foi *S. pneumoniae* (31,3%), seguido por *H. influenzae* (21,7%) e *M. pneumoniae* (7,6%).
- Das 166 amostras de pacientes diagnosticados com Covid-19, em 52,4% foi detectada pelo menos um dos três agentes bacterianos. E desses, 55,2% foram de pacientes com quadro grave ou crítico, incluindo um óbito.
- Do total de 354 amostras analisadas, em 51 (14,4%) foram detectados dois patógenos simultaneamente.
- O quadro de pacientes em estado grave ou crítico com a Covid-19 deve ser investigado, pois a gravidade aumentada pode ser atribuída a coinfeções bacterianas. Assim, mais estudos são recomendados para confirmar esse achado.
- Esse estudo visa contribuir com a identificação rápida e de menor custo, auxiliando no direcionamento das ações da vigilância epidemiológica e sanitária.
- Nossos resultados sugerem que a metodologia utilizada tem alta sensibilidade, permitindo identificar os patógenos bacterianos.
- A padronização de um método rápido e eficaz como a qPCR-HRM, que possui baixo custo e elevada especificidade e sensibilidade, e a sua implantação em laboratórios de referência e hospitais públicos, é fundamental para direcionar as ações de vigilância em saúde para acelerar e melhorar o prognóstico do paciente.
- A implementação dessa metodologia em laboratórios de referência poderá contribuir para o melhor monitoramento de casos de pacientes com IRA, com a limitação de não detectar patógenos não incluídos nas análises de PCR.
- A estratégia aqui proposta poderá possibilitar maior vigilância epidemiológica de IRA no país através da rápida identificação dos patógenos, além de contribuir para novas pesquisas com uso da qPCR-HRM para o monitoramento de outras doenças infecciosas.

7 REFERÊNCIAS

ALVIM, C.G; LASMAR, L. **Saúde da criança e do adolescente: doenças respiratórias**. Belo Horizonte: Editora Coopmed; Nescon UFMG, 2009.

ASHTIANI ZO, MEHRSAI AR, POURMAND MR, POURMAND G. High Resolution Melting Analysis for rapid detection of PIK3CA gene mutations in bladder cancer: A mutated target for cancer therapy. **Urol Oncol**. v.15, n.1, p.6000- 05, 2017.

AVALOS A.M, KENNETH G, JUAN A et al. SARS-CoV-2 and *Mycoplasma pneumoniae* coinfection: 6 case report from a peruvian hospital. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**. v.37, n.4, p.776 – 78, 2020.

BASTIAN MR, ROMERO IF, RAMOS JR, PABLOS M, RODRIGUEZ JG. Bacterial co-infections in COVID-19 pneumonia in a tertiary care hospital: Surfing the first wave. **Diagn Microbiol Infect Dis**.v.101, ed.3, 2021.

BEZERRA PG, BRITTO MC, CORREIA JB, et al. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. **PLoS One**. v.6, n.4, e18928, 2011.

BIGONI A, MALIK AM, TASCA R, CARRERA MBM, SCHIESARI LMC, GAMBARDELLA DD, MASSUDA A. Brazil's health system functionality amidst of the COVID-19 pandemic: An analysis of resilience. **Lancet**. v. 10, 100222. 2022.

BLACK, R.E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H.L., et al. For the Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF*. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**. v.375, p.1969–87, 2010.

BLASI F, ALIBERTI S, PAPPALETTERA M, et al. 100 years of respiratory medicine: pneumonia. **Respir Med**. 101(5):875-81, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **TRATO RESPIRATÓRIO: Critérios Nacionais de Infecções relacionadas à Assistência à Saúde**. Unidade de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos. p. 7-8. 2009.

BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dados sobre a COVID-19. 2022b. Disponível em: https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html Acesso em: 25 de Jun. 2022

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes Para Diagnóstico e Tratamento da COVID-19**. Brasília, 2020.

BRASIL. Pesquisa realizada na base de dados DATASUS, utilizando os limites “REGIÃO” para Linha, “ANO PROCESSAMENTO” para Coluna, “ÓBITOS” para Conteúdo, “2020 a 2022” para Períodos Disponíveis, “PNEUMONIA” para Lista Morb CID-10, “TODAS AS CATEGORIAS” para os demais itens. 2022a. Disponível em:

<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 06 jun. 2022.

BRUNDAGE JF. Interactions between influenza and bacterial respiratory pathogens: implications for pandemic preparedness. **Lancet Infect Dis**. v.6, ed.5, p303-12, 2006.

BUSTIN SA, MUELLER R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clin Sci (Lond)**. v.109, p.365–79, 2005.

CARDOSO A.M. A persistência de infecções respiratórias agudas como problema de saúde pública. **Cad Saúde Pública**. v.26 n,7, p.1270–1271, 2010.

CAULEY L.S, VELLA A.T. Why is coinfection with influenza virus and bacteria so difficult to control? **Discov Med**. v. 19, n.102, p.33-40, 2015.

CDC - Centers For Disease Control. *Haemophilus influenzae* type B. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/hib.pdf>. Acesso em: 22 junho 2022.

CDC - Centers For Disease Control. *Mycoplasma pneumoniae* infections. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pneumonia/atypical/mycoplasma/index.html> Acesso em: 22 de junho de 2022.

CHANG A, ADLOWITZ DG, YELLAMATTY E, PICHICHERO M. “Haemophilus influenzae outer membrane protein P6 molecular characterization may not differentiate all strains of H. Influenzae from H. haemolyticus.” *Journal of clinical microbiology* v.48, n.10, p.3756-7, 2010. doi:10.1128/JCM.01255-10

CHEN N, ZHOU M, DONG X, QU J, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**. v.395, p.507-13, 2020.

CONNEL JOE. RT-PCR Protocols. New Jersey: **Humana Press Totowa**, 2002.

CORRÊA RA, A, COSTA AN, B, LUNDGREN.C F, MICHELIM L, et al. recommendations for the management of community acquired pneumonia. **J Bras Pneumol**. v.44, ed.5, p.405-23, 2018.

CUTHBERTSON L, CRAVEN V, BINGLE L, COOKSON W, et al. The impact of persistent bacterial bronchitis on the pulmonary microbiome of children. **Plos One**. v.12, ed.12, 2017.

DE FILIPPIS I, DE ANDRADE CF, CALDEIRA N, DE AZEVEDO AC, DE ALMEIDA AE. Comparison of PCR-based methods for the simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in clinical samples. **Braz J Infect Dis**. v.20, ed.4, p.335-41, 2016.

DE SOUZA SANTOS DR, DO CARMO CN, DE FILIPPIS I. HighResolution Melting (HRM) for rapid MLST analysis of *Neisseria meningitidis*. **J Microbiol Methods**. v. 200, art.106557, 2022.

EDWARDS T, SASAKI S, WILLIAMS C, et al. Speciation of common Gram-negative pathogens using a highly multiplexed high resolution melt curve assay. **Scientific Reports**. v.8, p.1114, 2018.

ESPOSITO S, ZAMPIERO A, TERRANOVA L, et al. Pneumococcal bacterial load colonization as a marker of mixed infection in children with alveolar community-acquired pneumonia and respiratory syncytial virus or rhinovirus infection. **Pediatr Infect Dis J**. v.32, p.1199-1204, 2013.

FALSEY AR, BECKER KL, SWINBURNE AJ, NYLEN ES, FORMICA MA, HENNESSEY PA, CRIDDLE MM, PETERSON DR, BARAN A, WALSH EE, Bacterial Complications of Respiratory Tract Viral Illness: A Comprehensive Evaluation. **J Infect Dis**. v.208, p.432–41, 2013.

FARAH, S. B. Métodos de análise dos ácidos nucleicos. DNA: Segredos e Mistérios. 2 ed. São Paulo: **Sarvier**. cap. 4, p.114-27, 2007.

FILHO G.B. **Bogliolo. Patologia**. 7ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2006.

FISR- FÓRUM INTERNACIONAL DE SOCIEDADES RESPIRATÓRIAS. O Impacto Global da Doença Respiratória. Segunda edição – [Português]. 2017 Disponível em: https://gard-breathefreely.org/wp-content/uploads/2017/11/Firs2017_port_web.pdf Acesso em 22 jun. 2021.

FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia – 5. ed. rev. e atual. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

GALLUZZI L, CECCARELLI M, DIOTALLEVI A, et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasit Vectors**. v.11. p.273, 2018.

GAYAM V, KONALA VM, NARAMALA S, et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes of patients coinfecting with COVID-19 and Mycoplasma pneumoniae in the USA. **J Med Virol**. v.92, ed.10, p.2181-87, 2020.

GILL JR, SHENG ZM, ELY SF, et al. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections. **Arch Pathol Lab Med**. v.134, ed.2, p.235-43, 2010.

GRAHAM R, LIEW M, MEADOWS C, et al. Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. **Clin Chem**. v.51, p.1295– 1298, 2005

GUPTA R.K, GEORGE R, NGUYEN-VAN-TAM JS. Bacterial pneumonia and pandemic influenza planning. **Emerg Infect Dis**. v.14, n.8, p.1187-1192, 2008.

HAAS, D. J.; TORRES, A. C, Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revi Cien Med Vet**. n 26, 2016.

HOLLAND J, SPINDLER K, HORODYSKI F, GRABAU E, NICHOL S, VANDEPOL S. Rapid evolution of RNA genomes. **Science**. v.215, n.4540, p.1577-85. 1982.

HOOPER, L. V., LITTMAN, D. R., MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**. p.1268–73, 2012. DOI:10.1126/science.1223490

JAMIESON, AM, YU, S., ANNICELLI, CH E MEDZHITOV, R. Article influenza virus-induced glucocorticoids compromise innate host defense against a secondary bacterial infection. **Cell Host Microbe**. v.7, p.103-14, 2010.

JOSEPH, C., TOGAWA, Y., SHINDO, N. Bacterial and viral infections associated with influenza. **Influenza Other Respir. Viruses** 7 (Suppl. 2), 105–113, 2013.

KAMAU E, TOLBERT LS, KORTEPETER L, et al. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of Plasmodium by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. **J Clin Microbiol**. v.49, p.2946 –53, 2011.

KARAASLAN A, ÇETIN C, AKIN Y, DEMIR TEKOL S, SOBU E, DEMIRHAN R. Coinfection in SARS-CoV-2 Infected Children Patients. **J Infect Dev Ctries**. v.15, n.6, p.761-65, 2021.

KOZICH, J. J. *et al.* Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. **Applied And Environmental Microbiology**, v.79, n.17, p.5112-5120, 2013.

LANSBURY L, LIM B, BASKARAN V, LIM WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **J Infect**. v.81, ed.2, p.266-75, 2020.

LEE E.H, WU C, LEE E.U, et al. Fatalities associated with the 2009 H1N1 influenza A virus in New York city. **Clin Infect Dis**. v 50, p 1498-1504, 2010.

LEE L.N, DIAS P, HAN D, et al. A mouse model of lethal synergism between influenza virus and *Haemophilus influenzae*. **Am. J. Pathol**. v.176, p800–811, 2010.

LIAO, C.C; TSAI, M.H; LAI, S.H., et al. Safety and clinical application of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage in preterm neonates with clinical ventilator-associated pneumonia. **Pediatr Neonatol**. v.62, ed.2; p.195-201, 2021.

LI D, WANG D, DONG J, et al. False-Negative Results of Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Role of Deep-Learning-Based CT Diagnosis and Insights from Two Cases. **Korean J Radiol**. v.21, n.4, p. 505-508, 2020.

LIU J, LIAO X, QIAN S, YUAN J, WANG F, LIU Y, et al. Community Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, Shenzhen. **Emerg Infect Dis**. China, 2020.

MALHOTRA B, SWAMY MA, REDDY PV, et al. Evaluation of personalized multiplex real-time RT - PCR compared to the kit of 21 respiratory pathogens of Fast Track diagnostic for the detection of multiple respiratory viruses. **Viol J** 2016.

MARY C, FARAUT F, LASCOMBE L, DUMON H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **J Clin Microbiol.** v.42, p.5249–5255, 2004.

MELO FP. **Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para detecção de *Schistosoma mansoni***, Dissertação, UFP, Recife, p.114, 2006.

MIKUSOVÁ M, TOMCÍKOVÁ K, BRIESTENSKÁ K, KOSTOLANSKÝ F, VARECKOVÁ E. The Contribution of Viral Proteins to the Synergy of Influenza and Bacterial Co-Infection. **Viruses.** v.14, ed. 5, p.1064, 2022.

MORRIS DE, CLEARY DW, CLARKE SC. Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics. **Front. Microbiol.** v.8, p.1041, 2017.

MURPHY TF, BRAUER AL, SETHI S, KILIAN M, CAI X, LESSE AJ. *Haemophilus haemolyticus*: A Human Respiratory Tract Commensal to Be Distinguished from *Haemophilus influenzae*. **J Infect Dis.** v.195, ed. 1, p.81–9, 2007.

NETO AGM, LO KB, WATTOO A, SALACUP G, PELAYO J, DEJOY R, BHARGAV R, GUL F, PETERSON E, ALBANO J, PATARROYO-APONTE G, RANGASWAMI J, AZMAIPARASHVILI Z. Bacterial infections and patterns of antibiotic use in patients with COVID-19. **J Med Virol.** v.93, ed.3, p.1489-95, 2021.

NEUMANN M.L, MONUTEAUX M.C, SCULLY K.J, BACHUR R.G. Prediction of pneumonia in a pediatric emergency department. **Pediatrics.** v.128, ed.2, p.246-53, 2011.

OLIVEIRA, T. M.S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações.** Dissertação (Biologia), 111p. Universidade de Aveiro. Aveiro. Portugal. 2010.

OMS - Organización Mundial de la Salud. **Reglamento Sanitario Internacional.** Ginebra, 3° Ed, 2005.

REED GH, KENT JO, WITTEWER CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics.** v.8, p.597– 608, 2007.

REIS AD, FINK MCD, MACHADO CM, et al. CHIADO and RDGV/FAPESP Research Groups. Comparação das técnicas de imunofluorescência direta, cultura celular convencional e reação em cadeia da polimerase para detecção do vírus sincicial respiratório em aspirados nasofaríngeos de bebês. **Rev. Inst Med Trop.** São Paulo. v.50, p.37-40, 2008.

ROULEAU E, LEFOL C, BOURDON V, et al. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. **Hum Mutat.** v.30, ed.6, p.867-875, 2009.

RUSSJAN JK, CHUDZIAK J, BEDNAREK M, ANUSZEWSKA EL. Development of New PCR Assay with SYBR Green I for Detection of *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, and *Ureaplasma sp.* in Cell Cultures. v.11, ed.5, 2021.

SBPT- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Pneumonia. **J Bras Pneumol**. 2021. Disponível em: <https://sbpt.org.br/portal/t/pneumonia/> acesso em 01 de Abr. 2022.

SHARIFIPOUR E, SHAMS S, ESMKHANI M, KHODADADI J, FOTOUHI-ARDAKANI R, KOOHPAEI A, DOOSTI Z, EJ GOLZARI S. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. **BMC Infect Dis**. ed.1, p.646, 2020.

SMITH, A. M., MCCULLERS, J. A. Secondary bacterial infections in influenza virus infection pathogenesis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**. v.385, p.327–356, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES. **Doença pneumocócica (DP):** recomendações da Sociedade Brasileira de Imunizações (SBIIm) – 2019/2020 [atualizado em 21/02/2020].

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA (SBPT). Diretrizes brasileiras em pneumonia adquirida na comunidade em pediatria - 2007. **J Bras Pneumol**. v.33, p.31-50, 2007.

STEIN, R.T.; MAROSTICA, J.C.P. Community-acquired pneumonia. **Pediatric Respiratory Reviews**. v.7, p.136-137, 2006.

SOUZA JM, LINS LS, MEIRELES JMS, et al., Incidência de pneumonia em crianças no município de João Pessoa/PB no período de 2000 a 2008. **Revista do unipê**. v.14, n.2, p.147 – 50, 2010.

TIMBROOK TT, HUETH KD, GINOCCHIO CC. Identification of bacterial co-detections in COVID-19 critically ill patients by BioFire® FilmArray® pneumonia panel: a systematic review and meta-analysis. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.101, ed.3, 2021.

UNICEF - UNITED NATIONS INTERNATIONAL CHILDREN'S EMERGENCY FUND. **Pneumonia** 2022. Disponível em: <https://data.unicef.org/topic/child-health/pneumonia/> Acesso em 21 jun. 2021

WAITES K.B, XIAO L., PARALANOV V., et al. Mycoplasma and Ureaplasma. In: DE FILIPPIS I., MCKEE M. (eds) *Molecular Typing in Bacterial Infections*. **Infectious Disease**. Totowa, NJ: Publishing company: Humana Press, 2013. p. 219-281.

WATSON DE, LI B. TaqMan applications in genetic and molecular toxicology. **Int J Toxicol**. v.24, ed.3, p.139-45, 2005.

WHITMAN, WB. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 3ªed. Nova York: Springer, 1450p, 2009.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Coronavirus**. 2020a. Disponível em <<https://www.who.int/health-topics/coronavirus>> Acesso em 01 jun. 2020

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Updates and Monthly Operational Updates. 2022a. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> Acesso em 23 nov. 2022

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020b. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>. Acesso em 10 abr. 2021

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care WHO Guidelines. 2014. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112656/9789241507134_eng.pdf?sequence=1. Acesso e: 03 mar. 2021

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION: Pneumonia, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>. Acesso em 24 de maio de 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pneumonia in children. 2022b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia> Acesso em 23 nov. 2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Respiratory tract diseases. 2015. Disponível em:<http://www.who.int/topics/respiratory_tract_diseases/en/> Acesso em: 07 maio de 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Treatment Center for Severe Acute Respiratory Infections: A Practical Manual for Setting Up and Managing a Treatment Center for Severe Acute Respiratory Infections and a Screening Area for Severe Acute Respiratory Infections in Healthcare Establishments. 2020c. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331860/WHO-2019-nCoV-SARI_treatment_center-2020.1-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em 10 abr. 2021

ZHOU P, LIU Z, CHEN Y, XIAO Y, HUANG X, FAN XG. Bacterial and fungal infections in COVID-19 patients: A matter of concern. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v.41, ed.9, p.1124-25, 2020.