

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**COVID-19: FATORES PRÉ-ANALÍTICOS EM RT-PCR DE
PROTOCOLO ALTERNATIVO UTILIZADO NO MUNICÍPIO
DE JABOTICABAL/SP**

Giovana Rosa Luiz Alonso

Médica Veterinária

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**COVID-19: FATORES PRÉ-ANALÍTICOS EM RT-PCR DE
PROTOCOLO ALTERNATIVO UTILIZADO NO MUNICÍPIO
DE JABOTICABAL/SP**

**Discente: Giovana Rosa Luiz Alonso
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Paes Bürger**

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Medicina
Veterinária, na área de Medicina Veterinária
Preventiva.**

A454c Alonso, Giovana Rosa Luiz
Covid-19: fatores pré-analíticos em RT-PCR de protocolo alternativo utilizado no município de Jaboticabal/SP / Giovana Rosa Luiz Alonso. -- Jaboticabal, 2022
56 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Karina Paes Bürger

1. COVID-19 (Doença). 2. Saúde pública. 3. Diagnóstico. 4. Vigilância epidemiológica. 5. Pandemias. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: COVID-19: FATORES PRÉ-ANALÍTICOS EM RT-PCR DE PROTOCOLO ALTERNATIVO UTILIZADO NO MUNICÍPIO DE JABOTICABAL/SP

AUTORA: GIOVANA ROSA LUIZ ALONSO

ORIENTADORA: KARINA PAES BÜRGER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Medicina Veterinária, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Pesquisadora Dra. MARIA ANGÉLICA DIAS CONTI (Participação Virtual)
Setor de Vigilância de Vetores e Zoonoses / Secretaria da Saúde de Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 21 de novembro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Giovana Rosa Luiz Alonso, nascida no município de Santos - SP, aos vinte e um dias do mês de julho de 1994. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal, em 2012. Durante a graduação, realizou estágios em Clínica Médica de Pequenos Animais e Oftalmologia Veterinária. Foi membro efetivo do Grupo de Estudos em Pequenos Animais e bolsista no Programa de Educação Tutorial da Medicina Veterinária. Realizou estágio curricular obrigatório junto à equipe de Apoio Comercial da Reprodução Animal na Ourofino Agronegócio, sob supervisão do M.V. José Ricardo Garla de Maio. Obteve o título de Médica Veterinária em 2016. Atualmente é aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal, ao qual ingressou em 2020, sob orientação da Profa. Dra. Karina Paes Bürger.

*“Those who dream by day are
cognizant of many things which
escape those who dream only
by night.”*

— Edgar Allan Poe

DEDICATÓRIA

A todas as vítimas desta
terrível doença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Fernando e Cibele, e aos meus irmãos Fernando, Juliana e Mariana, por todo o apoio durante o período de graduação e pós-graduação. Aos meus avós Agostinho e Felisa por todo o suporte durante a graduação, nada seria possível sem vocês dois. Às minhas amigas e irmãs da faculdade que permanecem sempre presentes em minha vida, me apoiando e ajudando sempre que preciso. Um especial agradecimento a Marina Beanucci e Luciana Sfrizo, amigas sempre dispostas a me ajudar. Luciana me acolheu em sua casa durante vários meses e eu não poderia ser mais grata. A Maria Clara, minha mais nova sobrinha, agradeço por trazer ainda mais amor à vida deste maravilhoso ser humano que é a Luciana Sfrizo. A Carolina, eternamente presente em minhas memórias e em meu coração (in memoriam). Amo vocês. Obrigada por terem sido minha família em Jaboticabal e terem permanecido sempre presentes, mesmo após tanto tempo.

Esta pesquisa é fruto de um trabalho em equipe, e tudo foi possível graças à colaboração de diversas pessoas envolvidas no projeto pilar. A todos os professores, funcionários e residentes envolvidos neste projeto, agradeço imensamente pelo trabalho de vocês. A Andressa, por ter realizado os exames de RT-PCR de forma tão eficiente e meticulosa, mesmo durante um período tão difícil e importante em sua vida. Obrigada por me ensinar tanto, agradeço muito pelo seu trabalho. A Natália que me auxiliou muito na separação das fichas, obrigada. Ao professor Mathias, muito obrigada por toda a paciência em me ensinar e me guiar, além do grande conhecimento em estatística, ainda me auxiliou muito na correção gramatical do texto. Às professoras Annelise Camplesi, Adolorata A. Bianco, Ingrid Hoppe e Maria Angélica obrigada por comporem as bancas de defesa de projeto, qualificação e defesa desta dissertação, agradeço todas as orientações e sugestões que contribuíram para a melhoria do presente trabalho. À minha orientadora Professora Karina Paes Bürger, por me acolher em sua orientação e me proporcionar esta oportunidade e experiência tão única que é o mestrado. A todos os pacientes que integraram o projeto de pesquisa, agradeço pela confiança e pela colaboração. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Gratidão a todos

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 A covid-19	2
2.2 Medicina veterinária e as pandemias.....	3
2.3 Os sintomas clínicos	9
2.4 Epidemiologia e as medidas de controle da covid-19.....	11
2.5 Variantes e seus métodos de neutralização	15
2.6 Principais métodos de diagnóstico da covid-19 e seus desafios	17
2.7 Protocolo adaptado de RT-PCR para identificação de SARS-Cov-2	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Caracterização da área de estudo	24
4.2 Caracterização dos dados	25
4.3 Tabulação	26
4.4 Análise estatística	27

5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÃO	32
8. REFERÊNCIAS	33

COVID-19: FATORES PRÉ-ANALÍTICOS EM RT-PCR DE PROTOCOLO ALTERNATIVO UTILIZADO NO MUNICÍPIO DE JABOTICABAL/SP

RESUMO – Os sintomas da covid-19 são inespecíficos, o que dificulta seu diagnóstico clínico. A técnica molecular (RT-PCR) é a escolha padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial. Por meio do diagnóstico precoce da doença é possível monitorar o paciente, produzindo prognósticos mais favoráveis, além da importância epidemiológica de rastreamento dos casos positivos com indicação de isolamento de infectados e seus contactantes. Contudo, existem determinados fatores pré-analíticos que poderiam prever os resultados de testes e que merecem atenção. Por esse motivo, o presente estudo analisou os fatores pré-analíticos da RT-PCR de protocolo alternativo. Os fatores analisados foram idade, sexo, raça, sintomas relatados, comorbidades, parâmetros clínicos, período da sintomatologia clínica e qualidade da colheita da amostra (gene GAPDH). Utilizando 400 prontuários de pacientes atendidos no Centro de Atendimento ao Coronavírus (CAC) no Município de Jaboticabal/SP, determinou-se quais apresentaram associação com os resultados dos exames, por meio da técnica de regressão logística simples e multivariável. As variáveis significativas foram “alteração de olfato e/ou paladar” e “tosse”, com $P < 0,05$. Portanto, são sintomas frequentemente presentes, sendo indicativos na triagem para solicitar exame diagnóstico e, em casos de distúrbio olfatório, isolamento precoce e prolongado do paciente.

Palavras-chave: pandemias, covid-19, diagnóstico, vigilância epidemiológica, saúde pública;

COVID-19: PRE-ANALYTICAL FACTORS IN RT-PCR OF AN ALTERNATIVE PROTOCOL USED IN JABOTICABAL CITY, STATE OF SÃO PAULO

ABSTRACT – The symptoms of covid-19 are nonspecific, which makes its clinical diagnosis difficult. The molecular technique (RT-PCR) is the gold standard choice for laboratory diagnosis. Through early diagnosis of the disease, it is possible to monitor the patient, producing more favorable prognoses, in addition to the epidemiological importance of tracking positive cases with indication of isolation of infected and their contacts. However, there are certain pre-analytical factors that could predict test results that deserve attention. For this reason, the present study analyzed the pre-analytical factors of alternative protocol RT-PCR. The factors analyzed were age, sex, race, reported symptoms, comorbidities, clinical parameters, period of clinical symptoms and quality of sample collection (GAPDH gene). Using 400 medical records of patients treated at the Coronavirus Care Center (CCC) in the city of Jaboticabal, state of São Paulo, it was determined which ones were associated with the test results, using the simple and multivariate logistic regression technique. The significant variables were “alteration of smell and/or taste” and “cough”, with $P < 0.05$. Therefore, these symptoms are frequently present, being indicative in screening to request a diagnostic test and, in cases of olfactory disorder, early and prolonged isolation of the patient.

Keywords: pandemic, COVID-19, diagnosis, epidemiological surveillance, public health;

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	28
Tabela 2.	29
Tabela 3.	30

1. INTRODUÇÃO

A covid-19, doença de origem zoonótica, surgiu como um novo desafio à ciência, mudando completamente a dinâmica da sociedade moderna, inclusive em como lida-se com os testes de diagnóstico. A demanda de diagnósticos para a covid-19 cresceu de forma exponencial, muito rapidamente, o que não permitiu preparo e estudos suficientes para que se criasse uma padronização dos exames. Ao longo do tempo, foram realizados estudos epidemiológicos para que se criassem e planejassem estratégias de ação direcionadas, com o intuito de conter o número de infectados nesta terrível pandemia. Tais medidas, como distanciamento social, uso de máscaras, higienização constante das mãos, entre outros, puderam conter a expansão da doença até um certo ponto. Eram necessárias vacinas eficazes e aprovadas pelos órgãos de saúde, distribuídas e aplicadas de forma igualitária entre os países, para que se pudesse, de fato, frear a disseminação da doença. As vacinas aprovadas se concentraram em poucos países e novas variantes do vírus foram surgindo ao redor do globo. O atraso da vacinação e o negacionismo de parte da população quanto ao avanço científico das últimas décadas gerou uma mudança no perfil epidemiológico da covid-19. Por um longo período, a união entre vigilância epidemiológica, com testes de diagnóstico confiáveis, e monitoramento de envolvidos foram os únicos aliados no combate à pandemia da covid-19. No atual momento, com a disponibilização de vacinas no Brasil, ganhou-se um grande reforço nesta batalha, mas não deve-se abandonar os primeiros combatentes que permanecerão essenciais até o fim da pandemia.

Diante do exposto e do cenário epidemiológico precoce do Município de Jaboticabal/SP que desencadeou medidas de controle e prevenção da COVID-19 de forma precoce no Município, diferentemente dos demais municípios da região, o presente trabalho analisou os fatores pré-analíticos que influenciaram o diagnóstico molecular, protocolo alternativo de RT-PCR, em pacientes atendidos no Centro de Atendimento ao Coronavírus (CAC) no Município de Jaboticabal/SP, no período de 29 de Junho a 29 de Outubro de 2020.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A covid-19

O novo coronavírus foi identificado em Wuhan (China) ao final de 2019 como a causa de um surto de doença respiratória (“Severe Acute Respiratory Syndrome – Related Coronavirus 2” ou SARS-CoV-2), mas em fevereiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) nomeou a doença como “Coronavirus Disease 19” (covid- 19). Sua disseminação ocorreu rapidamente no território chinês, tornando-se uma epidemia de grande expressão. Atingiu inúmeros outros países ao redor do globo terrestre e, após espalhar-se por todos os continentes, em 11 de março de 2020, a OMS declarou que se tratava de uma pandemia (McIntosh et al., 2020; World Health Organization, 2020a; World Health Organization, 2020b). Após 9 dias do anúncio da OMS, o Ministério da Saúde do Brasil reconheceu o estado de transmissão comunitária em todo o território nacional (Ministério da Saúde, 2020a).

O SARS-CoV-2 foi isolado pela primeira vez em três lavagens broncoalveolares de pacientes de Wuhan, no dia 30 de dezembro de 2019. Após sequenciamento e análise evolucionária, o vírus foi considerado como parte dos β coronavírus. Sua análise filogenética indica que o SARS-CoV-2 compartilha 79,5% e 50% de identidade gênica com o SARS-CoV e o MERS-CoV, respectivamente (Zhu N et al., 2020). O vírus é uma partícula de diâmetro de 60 a 100 nm, sendo redondo ou oval. Possui RNA⁺ (direção 5'3'), envolto em nucleocapsídeo proteico fosforilado (N), e o nucleocapsídeo encontra-se dentro de uma membrana de bicamada lipídica. A membrana lipídica é coberta por duas proteínas spikes diferentes (S e HE), e entre elas há a proteína de membrana (M) e a proteína de envelope (E) (Wu F et al., 2020). O SARS-CoV-2 pode ser inativado por exposições a raios UV ou temperaturas de 56°C por 30 minutos, sendo também sensível a desinfetantes como éter, etanol 75%, cloro, ácido peracético e clorofórmio (Wei Pei-Fang, 2020).

Estudos buscaram compreender a patogenicidade da doença,

sugerindo que o vírus entra nas células humanas através do receptor ECA II (enzima conversora de angiotensina II), encontrado com maior expressividade no epitélio pulmonar e intestinal (Hamming I, 2004). Tal interação justificaria o fato de um dos principais sintomas ser respiratório (Chen J, 2020; Khan S et al., 2020). Como o receptor ECA II é abundante também em epitélio intestinal (intestino delgado), foi evidenciada a presença de vírus viáveis em fezes de pacientes com covid-19, indicando a possibilidade de transmissão por via oral-fecal (Han Y e Yang H, 2020). A fim de descobrir o potencial de infecção do SARS-CoV-2 em humanos, foi realizada uma análise do sítio de ligação ao receptor da proteína S que se conecta com a ECA II. A evidência biofísica e estrutural sugere que a proteína S provavelmente se liga ao receptor humano com afinidade 10 a 20 vezes maior do que o SARS-CoV (Wrapp D, 2020).

Um estudo genômico demonstrou que a origem do vírus em humanos parece ser zoonótica. Em meio à crise de saúde pública causada pela covid-19 é importante saber sua origem, pois entender como o vírus ultrapassou os limites interespecies pode ajudar em futuras prevenções de novas zoonoses (Andersen KG, 2020). A fase inicial de uma doença epidêmica é o momento ideal para que a vigilância molecular possa gerar informações sobre o rastreamento e controle do vírus. Além disso, os genomas virais podem ajudar a projetar diagnósticos moleculares eficazes, além de auxiliar no desenvolvimento da vacina (Park DJ et al., 2015; Gire SK et al., 2014). Os padrões de transmissão do vírus no Brasil foram investigados por meio de análise filogenética dos primeiros seis casos de coronavírus no país, concluindo que a passagem anterior foi a Itália (Jesus JG et al., 2020).

2.2 Medicina veterinária e as pandemias

O médico veterinário é profissional essencial da área da saúde, de acordo com a resolução nº 218 do Ministério da Saúde que os reconhece como profissionais de saúde de nível superior, além da resolução nº 287 que relaciona 14 categorias profissionais de saúde de nível superior para fins de atuação no CNS (Conselho Nacional de Saúde). O conceito e os princípios da “Saúde Única” não são

novos. Na verdade, as ameaças e consequências que surgem da indissociabilidade entre saúde animal, saúde humana e saúde ambiental têm sido, há muitos anos, a base de eventos que moldam a história. A interface entre ecossistemas, populações animais e as populações humanas sempre existiu (Evans BR e Leighton FA, 2014). A saúde e manutenção sustentável da vida selvagem nas reservas naturais, através da observação, pesquisa e interpretação de dados resultantes desta visão holística do processo saúde-doença, são mutuamente interdependentes com a saúde das comunidades e do gado ao seu redor, por exemplo (Osofsky et al., 2005).

A combinação de distúrbios ecológicos, mudanças na paisagem, comportamentos humanos e fatores de saúde pública contribui para a frequência de contatos entre humanos e animais selvagens, o que representa um risco de exposição a vírus de animais transfronteiriços (Leroy EM et al., 2020). Os vírus podem sofrer mutações facilmente e trocar de hospedeiro, adaptando-se a novas espécies. Para o controle de doenças infecciosas em populações animais, os veterinários são profissionais essenciais: aplicam medidas de biossegurança para evitar a introdução dos vírus nas populações, realizam vigilância por meio de testes de diagnóstico para identificar animais infectados, removem animais infectados de populações não infectadas e os vacinam para controle de longo prazo, promovendo a imunidade (Yoo HS e Yoo D, 2020). Além disso, muitos dos agentes biológicos com potencial de bioterrorismo são zoonoses, devendo haver constante vigilância de saúde animal e pública para a sua detecção rápida (Kahn LH, 2006).

Desde que o termo “One World One Health™” tornou-se marca comercial em Winnipeg, Canadá em 2009, a “saúde única” tem tomado força na última década com o fomento da conscientização, do debate científico, de programas de pesquisa, tais quais os existentes no site da organização “One Health Commission” (www.onehealthcommission.org), além das áreas de vigilância em saúde, estudos epidemiológicos e prestação de cuidados de saúde (Zinsstag J et al., 2009).

A adoção de políticas públicas efetivas na prevenção e controle de enfermidades, junto à ação conjunta entre diferentes setores, como parcerias público-

privadas inovadoras, é capaz de reunir recursos para a globalização no controle de doenças animais transfronteiriças, zoonoses e doenças tropicais negligenciadas. Esses esforços são do interesse não apenas dos países em desenvolvimento, mas também das nações industrializadas, pois reduziriam o risco de introdução dessas doenças em todo o mundo (Zinsstag J et al., 2011).

A primeira relação entre saúde única e o profissional médico veterinário vêm da medicina comparativa. Desde a primeira faculdade de veterinária do mundo, em Lyon na França, criada em 1761, Claude Bourgelat enfatizou sobre a importância da comparação biopatológica entre animais e humanos. Além disso, a faculdade foi criada primariamente para combater a epidemia de peste bovina, doença de grande preocupação da época (Barber-Lomax JW, 1964). Nos séculos 19 e 20 outras faculdades de veterinária foram criadas, com grande parte do foco educacional voltado ao controle de doenças em animais de produção, cavalos voltados ao trabalho e prevenção da transmissão de zoonoses (Gibbs SEJ e Gibbs PJ, 2012). O avanço das relações diretas da medicina veterinária com a saúde pública e as zoonoses, ocorreu no século 20 através de alguns veterinários como Karl Meyer, Calvin Schwabe e James Steele. Foram Schwabe e Steele que utilizaram o termo “One World, One Medicine, One Health” pela primeira vez para referir-se a este trabalho transdisciplinar (Monath et al. 2010). Não há profissão mais qualificada para promover a abordagem da interdisciplinaridade da saúde única e para liderar a implementação de seus preceitos do que a medicina veterinária (Gibbs SEJ e Gibbs PJ, 2012).

Apesar das diferentes áreas de atuação do médico veterinário atualmente, não há nenhum setor que não tenha envolvimento com a saúde única. A visão mundial do papel do médico veterinário na saúde única se resume a promover bem-estar animal, prevenir surtos de doenças, aumentar a produção animal, aumentar e apoiar a exportação animal, vigilância, diagnóstico e controle de doenças, fornecer conhecimento clínico e de saúde populacional para todos os animais e combater a resistência à antibióticos (Gibbs SEJ e Gibbs PJ, 2012). O médico veterinário deve se aproximar das pessoas e de seus territórios, de forma que possa identificar e avaliar fatores de risco à saúde relativos à interação humano-animal-meio ambiente em

domicílios e em áreas circunvizinhas, desenvolver ações de integralidade (conforme princípio do SUS), planejar estratégias multiprofissionais e aplicá-las. Portanto, estruturas de vigilância à saúde multissetoriais são necessárias e devem prover transparência de informações para todos os setores, além de responsabilidades compartilhadas para as tomadas de decisão (CFMV, 2009). Tais sistemas de vigilância devem seguir regulamentos, políticas e diretrizes realistas e implementáveis, compreender e determinar as funções e responsabilidades específicas, além de fornecer recursos técnicos, humanos e financeiros efetivamente usados e compartilhados de forma equitativa (Ozili PK e Arun T, 2020).

Os serviços de saúde animal contribuíram para uma resposta comum à pandemia de COVID-19. Mas isso não é uma colaboração exclusiva da pandemia, dado que laboratórios de saúde animal usam de sua experiência e conhecimento em alta capacidade de realização de testes diagnósticos de doenças infecciosas para auxiliar na medicina humana. Desta forma, podem engajar em atividades como triagem de vigilância e testagem de amostras humanas, oferecendo suporte à capacidade de diagnóstico dos serviços de saúde humana (Waltner-Toews D, 2017). O veterinário é especialmente importante na vigilância da fauna silvestre, o que se torna um parâmetro fundamental no controle das zoonoses emergentes, pois mudanças ecológicas, variações moleculares de agentes infecciosos e interações homem-animal silvestres representam os principais fatores para o surgimento de novos patógenos. Para evitar futuras zoonoses emergentes, é necessário estar preparado. A forma mais eficaz seria manter as barreiras naturais entre os animais que são reservatórios e a sociedade humana, aplicando o conceito da saúde única nessas ações (de Melo RT et al., 2020).

Infelizmente o SARS-CoV-2 não foi evitado e as investigações epidemiológicas mostram que a emergência dos patógenos da família coronavírus se deu pelo transbordamento zoonótico, no qual estes vírus, que anteriormente infectavam animais silvestres, passaram a infectar humanos, causando doenças graves de forma epidêmica (Mattar S & González M, 2018 ; Rodriguez-Morales AJ et al., 2020). Tais transbordamentos zoonóticos foram impulsionados por práticas

culturais de utilização de animais silvestres – morcegos, cobras e pangolins – como parte da dieta asiática. Como um agravo à esta situação, as leis sanitárias e regulatórias destes países para a comercialização e fiscalização da produção e venda de animais silvestres são frágeis (Cui J et al., 2019 ; Mattar S & González M, 2018).

Com a origem zoonótica do vírus SARS-CoV-2, deve-se lembrar do relatório Fronteiras 2016 do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), intitulado “Fronteiras 2016 sobre questões emergentes de preocupação ambiental”. Em que ressaltou, ainda na época, a necessidade de se discutir globalmente, com urgência, temas que estão interligados como a relação entre meio ambiente, questões sociais e economia, a degradação do meio ambiente e suas consequências (zoonoses), o surgimento local destas doenças e suas perspectivas de dispersão devido à globalização atual (migrações, imigrações e turismo) e buscar alternativas para o crescimento econômico sustentável, de forma que se possam resolver as questões socioambientais e sanitárias (UNEP, 2016).

Nas demandas da COVID-19 no Brasil, a atuação do médico veterinário foi reconhecida no Decreto 10.282/2020 que regulamenta a Lei 13.979 de 2020 dispostas no Art. 3º resguardando o exercício e funcionamento de serviços públicos e privados com atividades essenciais indispensáveis à população. Além disso, a atuação destes profissionais foram novamente reconhecidas na Portaria 639/2020 do Ministério da Saúde que dispõe sobre a Ação Estratégica “O Brasil Conta Comigo – Profissionais da Saúde”, voltada para a capacitação e cadastramento de profissionais da área de saúde junto ao enfrentamento da pandemia da COVID-19. Tais demandas estão inseridas no contexto de Saúde Única propostas pela OMS.

Dado o início da pandemia, houve proposta de uso de um protocolo geral ativo para a formação dos inquéritos epidemiológicos com base em amostragem aleatória. Frequentemente utilizado na vigilância de doenças de interesse veterinário, tais inquéritos possibilitariam identificar a proporção dos casos e a proporção da população livre da doença, construindo um entendimento do nível de infecção na população e sua real condição epidemiológica. Segundo os autores,

a adaptação do método auxiliaria na determinação de áreas prioritárias de vacinação, no conhecimento dos níveis imunológicos da população, na geração de parâmetros confiáveis para modelos de simulação, na identificação da proporção de casos assintomáticos e na base probabilística para que as medidas de restrição sejam abrandadas ou eliminadas (Foddai et al., 2020).

As zoonoses são importantes e devem ser evitadas através de medidas estratégicas. Conforme citado no relatório do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) e do Instituto Internacional de Pesquisa Pecuária (ILRI), 60% das doenças infecciosas já conhecidas e 75% daquelas emergentes são de caráter zoonótico. Nas últimas 2 décadas, antes da covid-19, a perda econômica por zoonoses foi de 100 bilhões de dólares americanos. O relatório identificou 10 ações que os governos podem tomar para evitar novas pandemias: investir em abordagens interdisciplinares (saúde única), incentivar pesquisas científicas sobre doenças zoonóticas, melhorar as análises de custo-benefício das intervenções para incluir o custo total dos impactos sociais gerados pelas doenças, aumentar a sensibilização sobre as doenças zoonóticas, fortalecer o monitoramento e a regulamentação de práticas associadas às doenças zoonóticas, inclusive de sistemas alimentares, incentivar práticas de gestão sustentável da terra e desenvolver alternativas para garantir a segurança alimentar e meios de subsistência que não dependam da destruição dos habitats e da biodiversidade, melhorar a biossegurança, identificando os principais vetores das doenças nos rebanhos e incentivando medidas comprovadas de manejo e controle de doenças zoonóticas, apoiar o gerenciamento sustentável de paisagens terrestres e marinhas a fim de ampliar a coexistência sustentável entre agricultura e vida selvagem, fortalecer a capacidade dos atores do setor de saúde em todos os países, operacionalizar a abordagem da saúde única no planejamento, implementação e monitoramento do uso da terra e do desenvolvimento sustentável, entre outros campos (United Nations Environment Programme & International Livestock Research Institute, 2020).

Tais afirmações são reforçadas por novos estudos, como o realizado na Austrália, que avaliou as contribuições de veterinários ao longo da pandemia. Os

veterinários foram os profissionais que identificaram a urgente necessidade de coordenar mais e maiores ações de saúde única, de forma a fortalecer as respostas às futuras pandemias (Steele et al., 2021). Nesse período da pandemia covid-19, as sociedades e os comportamentos humanos estão mudando rapidamente e, para acomodar essas mudanças, os papéis tradicionais dos veterinários devem evoluir de acordo. Os veterinários devem ter um papel significativo na manutenção de ecossistemas saudáveis e na proteção de animais e humanos contra infecções emergentes e transfronteiriças (Yoo HS e Yoo D, 2020).

2.3 Os sintomas clínicos

A Organização Mundial de Saúde (OMS), utilizando dados de um estudo, sugere que o vírus desenvolve a covid-19 de forma leve em cerca de 80% dos acometidos, e os seus 20% restantes podem necessitar de hospitalização (14%) ou de tratamento intensivo (6%) (Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team, 2020). O vírus iniciou sua jornada pandêmica com um perfil de preferências muito marcado. O desenvolvimento da doença, em sua forma mais severa, seguia indivíduos com os seguintes fatores de risco: tabagismo; idade avançada (65 anos ou mais); pacientes com doenças cardiovasculares; diabéticos; pessoas com doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e outras doenças respiratórias crônicas; câncer ou pessoas em estado de fragilidade imunológica; gestantes de alto risco; hipertensos descompensados; pacientes com obesidade; pessoas com doenças cerebrovasculares, doença renal crônica e doenças hepáticas (Wu Z e McGoogan JM, 2020; Du RH et al., 2020; Wang D et al., 2020; Liang W et al., 2020; Grasselli G et al., 2020; Silva ALO et al., 2020).

Um estudo utilizou dados da Pesquisa Nacional de Saúde e estimou que um terço (53 milhões) a quase metade (86 milhões) de brasileiros adultos apresentam ao menos um fator de risco para a forma severa da covid-19. Além disso, observou que adultos com menor grau educacional apresentam o dobro de prevalência de fatores de risco, quando comparados a adultos com ensino superior (Rezende LFM et al., 2020). Em uma análise intramunicipal da covid-19 no Município

do Rio de Janeiro, evidenciou-se maior vulnerabilidade à doença em comunidades carentes (Santos JPC et al., 2020).

As manifestações clínicas de covid-19 são variáveis, dado que há casos totalmente assintomáticos. Uma revisão analisou 350 estudos e estimou que 35.1% são assintomáticos, mas que no momento do teste este número é de 42.8% e quando compara-se idosos e crianças, chega-se a números como 19.7% e 46.7%, respectivamente (Sah P et al., 2021). Os sintomas podem iniciar entre 2 a 14 dias após a exposição ao vírus, tendo um período médio de incubação de aproximadamente 5 dias. Um estudo avaliando sintomáticos observou como os sintomas mais comuns a febre (98%), a tosse (76%) e a mialgia ou fadiga (44%); assim como os menos comuns, sendo produção de escarro (28%), dor de cabeça (8%), hemoptise (5%) e diarreia (3%). Mais da metade dos pacientes apresentaram dispneia em algum momento da doença (Huang C et al., 2020).

Um aplicativo foi desenvolvido para estudo de sintomas, o “The Covid Symptom Study”, com mais de 4 milhões de usuários. A equipe de cientistas analisou dados de cerca de 1,6 mil usuários positivos, no intuito de entender se sintomas específicos têm tendência a se manifestarem juntos e como isso se relaciona com a evolução da doença. Através dos dados, identificaram-se 6 "tipos" de covid-19, cada um caracterizado por um conjunto específico de sintomas: “gripe” sem febre (enxaqueca, perda de olfato, dor muscular, tosse, dor de garganta, dor no peito, sem febre); “gripe” com febre (enxaqueca, perda de olfato, tosse, dor de garganta, rouquidão, febre, perda de apetite); gastrointestinal (enxaqueca, perda de olfato, perda de apetite, diarreia, dor de garganta, dor no peito, sem tosse); grave nível um – fadiga (enxaqueca, perda de olfato, tosse, febre, rouquidão, dor no peito, fadiga); grave nível dois - confusão (enxaqueca, perda de olfato, perda de apetite, tosse, febre, rouquidão, dor de garganta, dor no peito, fadiga, confusão, dor muscular) e, por fim, grave nível três - abdominal e respiratório (enxaqueca, perda de olfato, perda de apetite, tosse, febre, rouquidão, dor de garganta, dor no peito, fadiga, confusão, dor muscular, dificuldade respiratória, diarreia, dor abdominal). Todos aqueles que relataram sintomas tiveram enxaqueca e perda de olfato, com diferentes combinações de sintomas adicionais em momentos diferentes. Os pacientes dos últimos três grupos eram em sua maioria mais velhos e com problemas de saúde

(propensos à obesidade e à doenças pré-existentes) – 8,6% a 19,8% necessitaram de assistência respiratória. Quase metade dos pacientes do último grupo precisou de atendimento hospitalar, em comparação apenas 16% do primeiro grupo precisou deste mesmo atendimento (Sudre CH et al., 2021).

A covid-19 pode ser persistente e causar sequelas ou outras complicações médicas que podem durar semanas a meses após a recuperação inicial da doença. Uma revisão realizou 21 meta-análises, sendo 47.910 pacientes incluídos, com idades entre 17 e 87 anos, e mostrou que podem haver 55 efeitos a longo prazo. Os estudos definiram que a covid longa pode durar entre 14 a 110 dias da pós infecção. Cerca de 80% dos pacientes infectados com o SARS-CoV-2 desenvolveram um ou mais sintomas longos, sendo os cinco mais comuns a fadiga (58%), dor de cabeça (44%), transtorno de atenção (27%), perda de cabelo (25%) e dispneia (24%) (Lopez-Leon S et al., 2021).

2.4 Epidemiologia e as medidas de controle da covid-19

A epidemiologia é um estudo essencial no controle de doenças, visto que é capaz de coletar os dados necessários para realizar a organização das estratégias de enfrentamento. Ou seja, epidemiologicamente, questões como a determinação das formas de disseminação viral (secreções e excreções respiratórias veiculadas por espirro, tosse, contato ou fômites) são fundamentais. O “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC americano) pondera que o período de incubação da covid-19 varia de 2 a 14 dias (Ministério da Saúde do Brasil, 2020). Quanto à distância a ser tomada de outros indivíduos para diminuir os riscos de transmissão, a OMS considera 1 metro, enquanto que o Ministério da Saúde do Brasil e o CDC americano consideram 2 metros (World Health Organization, 2020d; Centers for Disease Control and Prevention 2020a). Alguns cientistas da universidade de Oxford defendem que tais distâncias sejam reavaliadas, visto que as regras atuais de distanciamento não estão atualizadas junto à ciência moderna. Tais regras baseiam-se em um retrato extremamente simplista de transferência viral. As gotículas menores transportadas pelo ar devem ser consideradas, pois podem

viajar até 8 metros. O risco de transmissão do SARS-CoV-2 diminui à medida que a distância física entre as pessoas aumenta, devendo ser considerados os múltiplos fatores de risco para a infecção como ventilação, ocupação e tempo de exposição (Jones NR et al., 2020). Além disso, replicação viral pode começar 2 ou 3 dias antes dos sintomas aparecerem; ou seja, pacientes pré-sintomáticos são uma grande preocupação quanto a disseminação da doença (He X et al., 2020). Adicionalmente, o CDC dos EUA estimou, em cenários de planejamento, que 40% da transmissão do coronavírus está ocorrendo antes das pessoas ficarem doentes (Centers for Disease Control and Prevention, 2020b).

Um estudo realizado em Belo Horizonte concluiu que o distanciamento social vertical de 75% (apenas grupos de risco - idosos) como medida de controle epidemiológico da SARS-CoV-2 é quase tão ineficiente quanto nenhuma medida de distanciamento, através de um modelo matemático (SEIR-Net); enquanto um distanciamento horizontal de 75% é capaz de achatar a curva de casos, aliviando os hospitais e reduzindo o número vítimas fatais (Duczmal LH et al., 2020). No Brasil, a primeira medida de prevenção e controle adotada ocorreu no Distrito Federal no dia 11 de março de 2020, por meio de suspensão de aulas e eventos (distanciamento social horizontal). Em São Paulo, no dia 24 do mesmo mês, foi declarada “quarentena” (distanciamento social horizontal) por 15 dias, passível de prorrogação (Ministério da Saúde, 2020c). Contudo, grande parte da população brasileira não entendeu a importância do respeito ao distanciamento e muitos não aderiram às medidas. Em Belo Horizonte apenas 45% da população em geral adotou o distanciamento social, não sendo suficiente para a diminuir a disseminação de casos (Duczmal LH et al., 2020). O aumento exponencial de casos de covid-19 e mortes pelo mesmo vírus no Brasil foi um indicativo importante de que houve pouca adesão às políticas de distanciamento por parte da população. Outros países adotaram o “lockdown” como medida de controle e prevenção da doença e obtiveram resultados efetivos na redução de novos casos, comparado aos países que não adotaram (Alfano V e Ercolano S, 2020).

A luta contra a pandemia da covid-19 poderia ser subdividida em quatro fases: contenção, mitigação, supressão e recuperação. A contenção ocorre antes do primeiro registro de caso em um país ou região. A mitigação inicia quando a

transmissão da infecção já está instalada, nesta fase a finalidade é minimizar os níveis de transmissão da doença para os grupos de risco, além de realizar o máximo de testes diagnósticos possíveis e isolar os casos positivos. A supressão se faz necessária quando as medidas anteriores não são efetivas ou a redução alcançada na transmissão é insuficiente para impedir o colapso na atenção à saúde. Nesta fase há a implantação de medidas de distanciamento social horizontal ou de “lockdown”. Por fim há a fase desejada: a recuperação; tal fase se dá quando ocorre involução da epidemia e o número de casos se torna residual. Demanda muita organização dos líderes políticos, por, certamente, necessitar de intervenção do Estado e consciência da população para se reorganizar social e economicamente (Werneck GL e Carvalho MS, 2020).

A Atenção Primária à Saúde é um componente essencial do Sistema Único de Saúde (SUS) que tem sido esquecido devido ao elevado foco no funcionamento dos hospitais, ao longo desta pandemia. Durante o combate à epidemia de covid-19 no Brasil não há menções de investimentos ou fortalecimentos da Atenção Primária à Saúde (Ministério da Economia, 2020). Nos últimos anos, tal componente do SUS foi enfraquecido por cortes de financiamento do NASF ou mudanças na execução de seus programas (Souza CDF et al., 2020). O Programa Telessaúde foi implantado em 2011 e tem sido um ótimo instrumento no combate ao novo coronavírus. Trata-se de uma ferramenta de comunicação para que profissionais de saúde e seus gestores possam enviar suas dúvidas para o pessoal qualificado e, estes, respondem com informações baseadas nas evidências científicas atuais (Ministério da Saúde, 2011). Isso possibilitou que a Atenção Primária à Saúde reduza os encaminhamentos desnecessários de pacientes para níveis mais especializados.

Entre 2010 e 2016, mais de 23.000 internações foram evitadas graças à atenção primária, gerando uma economia de US\$ 6,1 milhões para os cofres públicos no Brasil (Organização Pan-Americana Saúde, 2018). Com a Atenção Primária à Saúde forte, há a possibilidade de: redução de internações desnecessárias, alívio do sistema hospitalar e aumento do número de leitos disponíveis para pacientes com covid-19; além de economizar os recursos

financeiros para o próprio sistema de saúde, garantindo sua funcionalidade (Kringos DS et al., 2013). A epidemia de covid-19 encontra a população brasileira em situação de extrema vulnerabilidade, com altas taxas de desemprego, cortes profundos nas políticas sociais e redução, também, das políticas de incentivos à saúde e à pesquisa. Precisamente em momentos como este, em meio a uma pandemia, a sociedade é capaz de perceber a importância da ciência e da saúde gratuita (Werneck GL e Carvalho MS, 2020). No Município de Jaboticabal, Estado de São Paulo, foi implantado um Centro de Atendimento ao Coronavírus (CAC). Trata-se de um centro de triagem para a covid-19 que tem como objetivo atender exclusivamente aos usuários que comparecerem à unidade por demanda espontânea ou encaminhados por outros pontos de atenção à saúde (G1 Ribeirão Preto e Franca, 2020).

Em contrapartida, há países como a Nova Zelândia que apresentou um número extremamente baixo de casos confirmados, assim como de mortes por covid-19. As autoridades de saúde do país fecharam suas fronteiras e declararam “lockdown” para eliminar o vírus SARS-CoV-2 o quanto antes; a política de combate e controle até o surgimento de vacinas serve como exemplo ao restante do mundo (Bandyopadhyay G e Meltzer A, 2020). A estratégia inicial de eliminação do novo coronavírus possui alguns elementos essenciais, como: controles de fronteira com quarentena de viajantes que chegam (antes de ocorrer o “lockdown”); detecção rápida de casos por testes generalizados, seguida de isolamento e rastreamento de contatos (quarentena para contatos); promoção intensiva de higiene e provisão de instalações de higiene das mãos em ambientes públicos; distanciamento físico intensivo ou “lockdown” (fechamento de escolas e locais de trabalho, restrições de movimento e viagens); comunicação bem coordenada para informar ao público sobre medidas de controle e promoção de saúde (Baker M et al., 2020).

Os números ao longo destes dois anos comprovam a eficácia no combate à covid-19 pela Nova Zelândia: 18.936 casos e 53 mortes até 20 de fevereiro de 2022. O governo escolheu uma estratégia de resposta baseada em confinamentos, no fechamento de fronteiras e na aplicação do plano vacinal (Agência Brasil, 2022). Após a reabertura das fronteiras, que iniciou no dia 27 de

fevereiro de 2022 (fase 1) e deve continuar até a fase 5, em Outubro de 2022, houve um significativo aumento de casos, mas com poucas mortes, visto que mais de 80% da população já está completamente vacinada (Johns Hopkins University and Medicine, 2022).

Um artigo analisou criticamente o Índice da Segurança Sanitária Global (ISSG) da Johns Hopkins University, utilizado como um indicador supostamente efetivo em estimar a capacidade de resposta dos países durante o primeiro ciclo da pandemia da COVID-19 do ano de 2020. O artigo observa que, durante o primeiro ciclo, o setor saúde dependeu da cooperação dos governos na adoção do distanciamento social e o ISSG não considerou o papel das lideranças políticas em suas análises (Costa, Nilson do Rosário et al., 2022). Desta forma, torna-se evidente a necessidade de uma boa liderança governamental em políticas públicas de saúde. O envolvimento completo da sociedade na adoção consciente de medidas preventivas contra a covid-19 requer uma mudança no comportamento individual e coletivo, prontamente. Com esta pandemia em vigor o Brasil pode aprender que seus impactos no país dependem de esforços colaborativos do governo e de seu povo (Oliveira AC e Lucas TC, Iquiapaza RA, 2020).

2.5 Variantes e seus métodos de neutralização

Há diferentes variantes de preocupação do vírus SARS-CoV-2 que surgiram ao longo destes 2 anos de pandemia. Ao final de 2020, no Reino Unido, foi publicado um artigo sobre a variante Alpha (B.1.1.7). Quando comparada às variantes anteriores, a Alpha era altamente transmissível e virulenta, podendo gerar mais mortes. Esta variante contém 17 mutações no genoma, na qual 8 são na proteína S, alvo antigênico de 3 vacinas aprovadas na Inglaterra (Burki T, 2021).

Outra variante muito infecciosa é a Gamma (P.1) que começou a circular no Brasil desde metade de 2020. Esta variante gerou inúmeras infecções em Manaus, levando o sistema de saúde a um colapso iminente (Burki T, 2021). A linhagem Gamma e a Beta (B.1.351), linhagem esta descrita na África do Sul ao final de 2020, compartilham três mutações em comum na proteína spike, além de algumas deleções. As mutações e deleções compartilhadas entre as linhagens P.1, B.1.1.7 e B.1.351 aparentemente surgiram de forma independente entre elas (Faria

NR et al., 2021).

A variante delta (B.1.617.2), que surgiu ao final de 2020 na Índia, possui 23 mutações quando comparada a primeira cepa de covid-19 identificada, a Alfa. Sendo que 12 dessas mutações ocorrem na proteína spike (Hodcroft EB, 2022).

Um estudo mostra que a variante delta possui o dobro de risco de hospitalizações quando comparado a variante alfa, além de sugerir que é mais comum em populações mais jovens e de maior renda (Sheikh A et al., 2021).

De acordo com a OMS, o primeiro caso confirmado da variante Omicron foi em novembro de 2021, na África (World Health Organization, 2021a). A OMS classificou a B.1.1.529 como variante de preocupação de forma muito rápida, trazendo grande atenção sobre ela. Poucos dias depois da identificação na África, a omicron se espalhou para outros países. Desde então, tal variante se espalhou rapidamente, aumentando novamente o número de casos mundialmente, mesmo com a vacinação já avançada, tornando-se dominante nos Estados Unidos em apenas um mês (World Health Organization, 2021b).

Os resultados de estudos filogenéticos indicam que a variante Omicron divergiu anteriormente de variantes mais antigas, não tendo sido fruto de mutações das mais recentes variantes de preocupação (Kupferschmid K, 2021).

Em menos de um ano após a declaração de início da pandemia de covid-19, já tinham sido aprovadas 6 vacinas. A primeira a ser aprovada para uso emergencial foi a Sputnik V no dia 11 de agosto de 2020, na Rússia, mesmo sem os testes finais aplicados. As primeiras a completarem os testes finais, o que foi considerado tempo recorde, foram as vacinas da Pfizer / BioNTech e Moderna (Pacheco TJA et al., 2020). As outras vacinas aprovadas para uso emergencial foram: Sinopharm, Coronavac e Oxford / AstraZeneca (World Health Organization, 2020e).

A eficácia das vacinas disponíveis varia de 51 a 95% para redução da covid-19 clínica e de 85 a 100% para prevenir infecções graves (Abdool Karim SS e de Oliveira T, 2021). Contudo, variantes como a Omicron tem desafiado a eficácia das vacinas, dado que algumas novas variantes apresentam mutações na proteína spike. A proteína spike é um alvo importante de muitas das tecnologias das vacinas, o que pode levar à evasão do sistema imune (Wang P et al., 2021; Moore JP e Offit

PA, 2021).

Mesmo com o uso das vacinas, enquanto a covid-19 for prevalente, o uso combinado de imunomoduladores ou agentes antiinflamatórios e antivirais pode ser a melhor terapia para a doença. O surgimento de medicamentos orais eficientes contra a covid-19 com preços acessíveis e o aumento contínuo da vacinação mundial deverá trazer um fim a pandemia (Fan Huahao et al., 2022).

Mas é importante lembrar que até o momento em que foram desenvolvidas as vacinas e os medicamentos contra a covid-19, a educação em saúde pública possuiu um importante papel sobre a prevenção e o controle dos efeitos desta doença no mundo (Sousa MRN et al., 2020).

2.6 Principais métodos de diagnóstico da covid-19 e seus desafios

Os sintomas expressos durante a infecção da covid-19 não são específicos, logo não podem ser utilizados para um diagnóstico preciso. Técnicas moleculares são a melhor escolha para um diagnóstico confiável, quando comparadas a testes sindrômicos ou tomografias. Isto ocorre porque são capazes de identificar os patógenos específicos. A RT-PCR é o teste molecular considerado padrão-ouro, pois identifica a presença do vírus na amostra de pacientes com sintomas clínicos em fase aguda a doença. O exame é utilizado em casos suspeitos de covid-19, sendo parte de diferentes protocolos de triagem, dado que apresenta 95% de sensibilidade ou mais em 97,05% dos 34 testes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (Centers of Disease Control Prevention, 2020c; Verotti MP et al., 2020).

A RT-PCR envolve a transcrição reversa da fita de RNA em DNA complementar (cDNA), seguido de amplificação de regiões específicas do cDNA, para que possa ser observada a presença daquele material genético na amostra, seja através de PCR convencional, com análise em gel ou através da PCR em tempo real (RT-qPCR) (Freeman WM et al., 1999; Kageyama T et al., 2003). Há três regiões virais com sequências conservadas: o gene RdRP, o gene E e o gene N. Tanto o RdRP, quanto o E têm alta sensibilidade para detecção, enquanto que o gene N, menor sensibilidade. Podem ser realizados ensaios com dois genes-alvos,

utilizando um primer para cada gene, aumentando a confiabilidade do exame. Após os desenvolvimentos dos primers e das probes (em casos de RT-qPCR), deve-se otimizar as condições para o ensaio, como reagentes, tempo de incubação e temperaturas ideais, para que, assim, possa iniciar os testes de RT-PCR para covid-19 (Corman V et al., 2020).

Apesar do método padrão-ouro ser a RT-PCR, existem outros métodos diagnósticos sendo utilizados para a detecção da covid-19, como os kits de teste rápido para o antígeno causador da covid-19, feito através de imunocromatografia (Fenollar F et al., 2021). Quando comparado ao RT-PCR, o teste de antígeno possui menor tempo para o resultado, podendo ser visto a partir de 15 minutos e informado dentro de 1 a 2 horas após a aplicação do teste, além de possuir menor custo. A técnica utilizada para a colheita de amostras é de swab de nasofaringe, assim como o RT-PCR. O teste rápido de antígeno possui sensibilidade inferior ao teste de RT-PCR (74-87%), principalmente em indivíduos assintomáticos com cargas virais baixas. Porém, em pacientes com carga viral elevada, o que costuma ocorrer na fase pré-sintomática, de 1 a 3 dias antes dos sintomas, e na fase sintomática inicial, até o 5º dia, a sensibilidade é superior a 90% quando comparada ao teste de RT-PCR. Já a sua especificidade sofre uma variação de 96-100%, revelando que os resultados positivos são muito seguros, por se tratar de diagnóstico através do antígeno (Matsuda EM et al., 2021; Takeuchi Y et al., 2021). Contudo, a sensibilidade pode variar conforme a qualidade do teste utilizado, como no caso do Coris COVID-19 Ag Respi-Strip test que apresentou 30,2% de sensibilidade em um determinado estudo (Schohy A et al., 2020).

Há, ainda, o teste sorológico, que se divide entre “teste sorológico convencional” e “teste rápido”. O primeiro é realizado com ensaios imunoenzimáticos ou eletroquimioluminescência e o segundo utiliza metodologia imunocromatográfica. São testes que buscam os anticorpos contra os antígenos do SARS-COV-2, IgG, IgM e IgA, podendo ser detectados em amostras de sangue total, soro ou plasma. A acurácia dos testes sorológicos irá depender da metodologia aplicada, do antígeno utilizado e do momento da colheita (idealmente após 10º dia para IgM, IgA e anticorpos totais e, após 15º dia, para IgG) (Centers of Disease Control Prevention, 2020d). Dos testes imunocromatográficos sorológicos, a sensibilidade IgG/IgM variou

de 72% até 100% e especificidade de 32% até 100% em estudo baseado nos testes diagnósticos registrados pela Anvisa (Verotti MP et al., 2020).

Os testes sorológicos para covid-19 têm função principal de auxílio complementar no diagnóstico, quando o RT-PCR fornece resultado negativo. São também usados para pacientes tardios, que se consultam apenas após duas semanas do início dos sintomas, quando o período ideal da coleta de RT-PCR já terminou (Sethuraman N et al., 2020). Um outro método de diagnóstico que tem sido amplamente empregado ao longo da pandemia da covid-19 é a Tomografia Computadorizada em região de tórax. Trata-se de um exame não invasivo e com alta sensibilidade (86%–98%), mas com maiores taxas de falsos negativos quando comparado ao RT-PCR, dado a baixa especificidade (25%) (Ai T et al., 2020).

O avanço em testes de diagnóstico é de extrema importância, dado que tais testes auxiliam na epidemiologia (rastreamento de casos e contenção de surtos). Contudo, existem determinados fatores que influenciam nos resultados dos testes diagnósticos e que merecem nossa atenção. As amostras para a análise de RT-PCR são colhidas com suabes nasais e orofaríngeos, principalmente; o escarro, a secreção traqueal e a lavagem broncoalveolar são colhidos apenas em pacientes críticos. Todavia, o protocolo da RT-PCR é complexo e requer diversos cuidados, seja na sua execução ou em seus fatores interferentes pré-analíticos, como a colheita, o transporte e o armazenamento das amostras. Erros de execução ao longo destes fatores pré-analíticos, pode gerar resultados não confiáveis em análises laboratoriais (World Health Organization, 2020e). Portanto, apesar de se tratar de um exame laboratorial específico, sua sensibilidade pode variar com tais fatores.

A fase da infecção e sua carga viral em tecido, secreções e excreções contemplam um dos principais fatores que influenciam no diagnóstico final. Amostras retiradas do trato respiratório superior, colhidas com menos de três dias ou mais de 10 dias do início da infecção, possuem menor carga viral, podendo resultar em falsos negativos (Tang YW et al., 2020). O suabe nasofaríngeo e o orofaríngeo são frequentemente recomendados para o diagnóstico precoce da infecção, mas a carga viral está normalmente mais alta entre o quinto e o sexto dias do início dos sintomas (Pan Y et al., 2020; Zou L et al., 2020).

A colheita é um passo de muito importante dentro do diagnóstico, dado que inúmeros fatores podem afetar a qualidade do teste, como o local de introdução do swabe, o manuseio deste, o tempo que permanece em contato com o tecido do paciente, a qualidade do swabe, o meio em que este está sendo alocado, a temperatura em que permanece até a chegada no laboratório, entre outros. Com a situação de pandemia houve, ainda, outros problemas como a limitação de insumos para a realização dos exames laboratoriais, o que deve ser avaliado com cautela na hora de se comprometer a realizar os exames, alguns insumos não podem ser substituídos por outros semelhantes, devido a qualidade dos materiais (Druce J et al., 2012).

Além da variação cronobiológica da carga viral e fatores de coleta, transporte e armazenamento de amostras, há outros fatores pré-analíticos importantes dentro do processo diagnóstico. Um deles é inerente ao paciente: a idade. Um estudo identificou que pacientes mais jovens apresentaram mais exames de RT-PCR negativos (apesar de infectados), além de terem sintomas mais brandos. Isso se deve a menor carga viral, visto que pacientes com maior idade foram associados a maiores cargas virais (observadas nos testes de RT-qPCR) (X Hu et al., 2020). Tais conclusões refletem os resultados de outro estudo que demonstra que a idade e a carga viral são diretamente proporcionais (KK To et al., 2020). Contudo, é importante ressaltar que tais estudos foram elaborados no início da pandemia, momento no qual as variantes existentes eram mais brandas e pouco afetavam os jovens, o que atualmente com a variante p1 mudou drasticamente. A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) divulgou dados de indicam que adultos infectados com essa variante, jovens ou não, têm carga viral até 10 vezes maior (BBC News Brasil em Londres, 2021; Naveca F et al., 2021).

De forma geral, a pandemia tem somado novos fatores influenciadores do diagnóstico aos que normalmente já ocorrem em tempos normais. A ausência de padronização de conduta é um deles e em meio a pandemia tem prejudicado a confiabilidade e segurança dos resultados diagnósticos, além de retardar o controle da disseminação da doença. Diante das incertezas do momento vivido, necessitaria existir uma priorização de coleta sistemática e prospectiva de dados e informações

diagnósticas e terapêuticas por médicos que estão atuando na atenção básica, de forma a gerar dados epidemiológicos e novas conclusões científicas para criar condutas padrões definitivas o quanto antes.

A pandemia da covid-19 institui um bom exemplo para futuras novas pandemias, já que o aprendizado têm sido constante, seja com os erros ou acertos. Infelizmente, dado o despreparo das instituições de saúde de diversos países, mudanças de padrões de conduta decorrem incessantemente, pois novas informações são divulgadas em diferentes canais de informações a todo o tempo, havendo atrasos de informações entre diferentes instituições e seus respectivos profissionais. À medida que surgem novas constatações, criam-se novos padrões, não sendo necessariamente embasados apenas em conceitos científicos. O ambiente da saúde pública brasileira sofre crescente politização em decisões técnicas, quando a orientação para tais decisões deveria ocorrer apenas por meio da ciência e ética, sem desvios de conduta (Dantas F, 2020). Considerando a relevância mundial desta pandemia para a Saúde Pública e a necessidade de se padronizar as condutas em relação a essa enfermidade, idealizou-se o presente estudo.

2.7 Protocolo adaptado de RT-PCR para identificação de SARS-Cov-2

A fim de conter a pandemia e isolar as pessoas infectadas, o diagnóstico do vírus SARS-CoV-2 da forma mais precoce possível foi primordial. Neste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) preconizou a detecção do vírus por RT-PCR em tempo real (CORMAN, et al., 2020; CDC, 2020).

Primeiramente, foram padronizados os kits de extração de RNA mundialmente reconhecimentos e a utilização de sondas fluoromarcadas. No entanto, países que utilizam insumos importados, como o caso do Brasil, passaram a enfrentar o problema de falta de insumos e atrasos nas entregas. Além disso, ressalta-se o grande montante financeiro requerido para a aquisição de kits de extração de RNA que utilizam purificação por colunas de sílica ou por beads magnéticas, e de sondas fluoromarcadas. Somado à estas dificuldades, há o grande potencial infeccioso do novo coronavírus. Vários profissionais ficaram expostos ao elevado risco de serem infectados por estarem diariamente em contato com

amostras potencialmente positivas, inclusive, alguns destes profissionais, mesmo tomando os devidos cuidados, foram acometidos pela doença (CEBM, 2020).

Tendo em vista os números crescentes de infectados e mortes ocasionadas pelo novo coronavírus no Brasil e as dificuldades supracitadas, a padronização e validação de protocolos de identificação molecular que utilizam insumos de fácil acesso, menos onerosos e que ofereçam maior proteção aos profissionais envolvidos foi de suma importância. Como alternativa aos kits de extração de RNA que utilizam purificação por colunas e beads magnéticas, destaca-se a utilização do Trizol ou Tri-Reagente, um reagente comercial que substituiu os tampões de extração de RNA feitos *in house*. Este reagente é composto principalmente por isotiocianato de guanidina que é um agente caotrópico, ou seja, um desnaturante protéico usado para lisar células e vírus em extrações de RNA e DNA e, além disso, é um impeditivo da ação enzimática de RNAses e DNAses, desnaturando-as; e por fenol que é um efetivo purificador de ácidos nucleicos. O trizol, amplamente utilizado para extração de RNA, tem se mostrado eficiente na inativação de vários tipos de vírus (KOCHEL et al., 2017) e, além disso, pode preservar a amostra contendo o vírus e garantir o rendimento de RNA mesmo em temperatura ambiente (25°C - 37°C) por até quatro semanas (HOFMANN et al., 2000). Sendo assim, este reagente é ideal para o transporte de amostras, inativação do vírus e preservação do material genético, além de ser menos oneroso. Uma das desvantagens do trizol consiste na geração de resíduos químicos de fenol e clorofórmio que necessitam ser descartados de maneira apropriada.

Em relação à etapa de amplificação de RT-PCR, a alternativa às sondas fluoromarcadas e aos fluoróforos é a utilização da PCR convencional aplicando-se a etapa de nested-PCR, ou seja, de reamplificação dos produtos de PCR iniciais para aumentar a quantidade de amplicons a um nível de detecção compatível com aquele obtido em equipamento de PCR em tempo real (PARK et al., 2020). A união desses dois métodos alternativos, utilização de trizol e PCR convencional consistiu em uma alternativa interessante para acelerar as identificações do vírus no Brasil e, inclusive, permitir a utilização de laboratórios NB1 para as análises moleculares, uma vez que juntos, o isotiocianato de guanidina e o fenol, inativam completamente o vírus.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar quais fatores pré-analíticos influenciaram o diagnóstico molecular, realizado com protocolo alternativo de RT-PCR, em pacientes atendidos no Centro de Atendimento ao Coronavírus (CAC) no Município de Jaboticabal/SP, no período de 29 de Junho a 29 de Outubro de 2020.

3.2 Objetivos específicos

- Relacionar idade, sexo, raça, sintomas relatados, comorbidades, parâmetros clínicos, período da sintomatologia clínica do suspeito no momento da colheita da amostra e qualidade da colheita (gene GAPDH) com os resultados do diagnóstico molecular da covid-19 pelo protocolo alternativo;
- Analisar os fatores pré-analíticos que podem influenciar o diagnóstico molecular da covid-19 na aplicação do protocolo proposto;

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho é um estudo observacional retrospectivo que compõe um projeto amplo intitulado “Diagnóstico molecular de pacientes infectados por SARS- CoV-2 no Município de Jaboticabal/SP: emprego de protocolo seguro e de baixo custo”. O projeto, sob responsabilidade da Profa. Dra. Adolorata Ap. Bianco Carvalho, foi inserido na Plataforma Brasil e autorizado de acordo com a legislação vigente, com parecer de número 4.165.106. Neste projeto foi disponibilizado verba para realização de 400 exames de RT-PCR. As amostras deveriam ser colhidas no Centro de Atendimento ao Coronavírus (CAC), após triagem de pacientes suspeitos de estarem infectados pela doença. A triagem foi realizada pelos profissionais de atendimento médico, sendo previamente orientados pela equipe do projeto sobre a necessidade de selecionar pacientes com tempo de sintomatologia mínimo de 3 dias e máximo de 7 dias. Para tanto, foram utilizados os dados dos prontuários de

atendimento médico de 400 pacientes submetidos a colheita de amostra no CAC para diagnóstico molecular, protocolo alternativo, no Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEM) do setor de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da FCAV/Unesp/Jaboticabal/SP, no período de 29 de junho a 29 de outubro de 2020.

O diagnóstico molecular, protocolo alternativo, empregado para a realização dos testes foi a PCR convencional (reagentes Invitrogen™), com extração de RNA por Trizol™ (Thermo Fischer Scientific Inc), Transcriptase Reversa (SuperscriptIV™ – Thermo Fisher Scientific Inc), Termociclador Veriti (Eppendorf™) e eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen™). Foi realizada a detecção do gene E (proteína Envelope) e do gene N (nucleoproteína) (Corman VM et al., 2020) do vírus SARS-CoV-2. Para a detecção de células humanas foi utilizado o Gene GAPDH (poliproteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) (Birkenheuer AJ et al., 2003).

4.1 Caracterização da área de estudo

O Município de Jaboticabal localiza-se na região nordeste do Estado de São Paulo, na Mesorregião de Ribeirão Preto, nas coordenadas 21°15'18.00" Sul e 48°19'19.20" Oeste. O Município faz parte da Macrorregião de Saúde Nordeste do Estado de São Paulo, do Departamento Regional de Saúde (DRS) de nº XIII – Ribeirão Preto, na região Horizonte Verde e pertencente ao Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) nº XXIV.

O histórico epidemiológico da covid-19 no município teve um início precoce em março de 2020 (16.03.20) com uma paciente com síndrome gripal que havia retornado de um cruzeiro com aproximadamente 3.000 passageiros e 1.000 tripulantes. A partir disso, a Secretaria de Saúde, por meio da Vigilância Epidemiológica, iniciou a investigação epidemiológica, o monitoramento dos municípios envolvidos e, assim, confirmou-se a circulação do novo coronavírus (SARS-Cov-2) no município.

Desde então, o poder público procura equilibrar a tripla ameaça que esta pandemia representa para a saúde das pessoas, para o bem-estar social e para a economia. A Secretaria de Saúde implantou medidas para conter o risco de disseminação da covid-19 com envolvimento de toda a sociedade em medidas de

higiene para redução de transmissibilidade; distanciamento social para pessoas acima de 60 anos; distanciamento social para pessoas abaixo de 60 anos com doenças crônicas; distanciamento social no ambiente de trabalho (reuniões virtuais, trabalho remoto, extensão do horário para diminuir densidade de equipe no espaço físico); isolamento domiciliar de sintomáticos e contatos domiciliares, exceto profissionais de serviços essenciais assintomáticos, e proibição de qualquer evento de aglomeração.

Esse episódio desencadeou medidas de controle e prevenção da covid-19 de forma precoce no Município, diferentemente dos demais municípios da região, o que facilitou o fortalecimento da capacidade de resposta dos serviços de saúde. Diante disso, observou-se um pico precoce com 18 casos confirmados em março de 2020, seguido por um período de transmissão limitada, com sete casos confirmados em abril do mesmo ano, consequência da adoção das medidas de controle e prevenção.

As autoridades de saúde ajustaram e coordenaram a resposta com base nos dados epidemiológicos, como os oriundos do Centro de Atendimento ao Coronavírus (covid-19) - CAC. O município foi o primeiro da região a implantar um centro de triagem com o objetivo atender e monitorar os casos suspeitos de covid-19, demanda espontânea ou encaminhados pelas unidades básicas de saúde. Nesta fase inicial do enfrentamento o foco das ações estava na detecção precoce de casos suspeitos, testagem quando indicada, investigação epidemiológica dos contatos e isolamento domiciliar, além do cumprimento das normas de quarentena do governo do Estado.

4.2 Caracterização dos dados

Os dados avaliados nos prontuários foram: idade, sexo, raça, sintomas relatados (alteração de olfato e/ou paladar, cefaleia, coriza, diarreia, dispneia, dor abdominal, dor de garganta, fadiga/cansaço, febre/calafrio, mialgia/artralgia, náusea/vômito, perda de peso excessiva, tosse e urticária/coceira), comorbidades (asma/bronquite, diabetes, doença cardíaca, doença imunológica, doença hepática, doença renal, hipertensão arterial sistêmica – HAS, obesidade e tabagismo), parâmetros clínicos (saturação de O₂, pulso e temperatura) e tempo de sintomatologia

no dia da coleta para RT-PCR. Além do gene GAPDH (positivo ou negativo), conferindo a qualidade da colheita da amostra e relacionando com os resultados do diagnóstico molecular de protocolo alternativo.

As comorbidades relatadas foram perguntadas diretamente aos pacientes, sendo incluídas doenças compensadas e descompensadas na mesma categoria. Foram consideradas como doença cardíaca todas as cardiopatias, exceto HAS. Na categoria de doenças imunológicas foram considerados HIV, doenças reumatológicas e câncer; para doença renal foi considerada presença de insuficiência renal crônica, insuficiência renal aguda e outras nefropatias que não HAS. Foram consideradas doenças hepáticas as hepatopatias crônicas. Na categoria de tabagista foram incluídos tanto pacientes tabagistas no momento da consulta quanto ex-tabagistas, contanto que tivessem mantido esse hábito por mais de 1 ano.

4.3 Tabulação

A pesquisa buscou tabular os dados epidemiológicos coletados destes 400 prontuários dentro de uma planilha de Excel. Durante o preparo dos dados, as variáveis existentes foram divididas entre potenciais variáveis efeito e potenciais variáveis causais. As variáveis efeito foram: gene N (PCR N) e gene E (PCR E). As variáveis causais foram: qualidade da colheita da amostra (gene GAPDH), idade, sexo, raça, sintomas relatados (alteração de olfato e/ou paladar, cefaleia, coriza, diarreia, dispneia, dor abdominal, dor de garganta, fadiga/cansaço, febre/calafrio, mialgia/artralgia, náusea/vômito, perda de peso excessiva, tosse e urticária/coceira), comorbidades (asma/bronquite, diabetes, doença cardíaca, doença imunológica, doença hepática, doença renal, hipertensão arterial sistêmica – HAS, obesidade e tabagismo), parâmetros clínicos (saturação de O₂, pulso e temperatura) e tempo de sintomatologia no dia da coleta para PCR. Os resultados não numéricos destas variáveis foram codificados com números, sendo estes: positivo (1), negativo (0); feminino (1), masculino (2); raça branca (1), raça amarela (2), raça parda (3), raça preta (4); sim (1), não (0).

4.4 Análise estatística

Inicialmente compararam-se os resultados da PCR para detecção do gene E com os resultados da PCR para detecção do gene N, o que revelou 100% de resultados concordantes. Em seguida, investigou-se a associação entre o resultado da PCR (positivo ou negativo) e as variáveis explanatórias por meio do teste exato de Fisher, no caso das variáveis categóricas, utilizando o software Epi Info 7.2.4.0. Quanto às variáveis explanatórias quantitativas, examinou-se inicialmente a normalidade dos dados dos dois grupos, e havendo normalidade investigou-se a igualdade das variâncias. Havendo normalidade e igualdade das variâncias, a comparação entre os dois grupos foi realizada por meio do teste t para comparação de duas médias. Nos casos em que os dados não apresentavam distribuição normal, a comparação entre os grupos foi feita por meio do teste da soma dos ranques de Wilcoxon com correção de continuidade. Essas análises foram realizadas por meio do software R. As variáveis com valor de P abaixo de 0,20 foram submetidas a análise de regressão logística simples, ou seja, uma variável por vez, sendo então selecionadas variáveis explanatórias com valor de P abaixo de 0,10 e cuja direção da associação tivesse nexo do ponto de vista biológico. A partir das variáveis selecionadas nesta etapa buscou-se a obtenção de modelos logísticos múltiplos com variáveis que mantivessem valor de P abaixo de 0,05 no mesmo modelo. Avaliou-se o ajuste do modelo logístico por meio do teste de Hosmer-Lemeshow utilizando o pacote “ResourceSelection” do software R.

5. RESULTADOS

A análise univariada permitiu observar associação significativa ($P < 0,05$) entre os resultados da PCR e as variáveis “perda de olfato”, “dispneia” e “tosse”; no entanto, “dispneia” apresentou “odds ratio” (OR) significativamente menor do que 1, indicando relação inversa com o resultado da PCR (Tabela 1), e por isso essa variável foi desconsiderada nas análises seguintes. Além de “perda de olfato” e “tosse”, as variáveis “febre”, “mialgia” e “doença cardíaca”, que apresentaram valor de P abaixo de 0,10 na análise de regressão logística simples, foram selecionadas

para a obtenção de modelos logísticos múltiplos. Nenhuma das variáveis quantitativas apresentou associação com o resultado da PCR (Tabela 2) e, portanto, não foram avaliadas em modelos logísticos múltiplos.

Tabela 1 – Análise univariada das variáveis explanatórias categóricas e sua relação com o resultado da PCR para diagnóstico de infecção por SARS-COV-2, Jaboticabal, SP, 2020.

Variável	Categoria	Positivos/examinados	OR (IC95%)	P
Sexo	Masculino	12/160 (7,50%)	1,0 (0,4679 – 2,1372)	1,00
	Feminino	18/240 (7,50%)		
Etnia	Branca	20/271 (6,87%)	-----	0,1847
	Amarela	1/2 (50,00%)		
	Parda	3/49 (6,12%)		
	Preta	2/19 (10,53%)		
Perda olfato	Sim	11/74 (14,86%)	2,812 (1,2755 – 6,1994)	0,0133
	Não	19/325 (5,85%)		
Cefaleia	Sim	11/176 (6,25%)	0,7193 (0,3329 – 1,5541)	0,4486
	Não	19/224 (8,48%)		
Coriza	Sim	13/129 (10,08%)	0,6678 (0,784 – 3,548)	0,2227
	Não	17/270(6,30%)		
Diarreia	Sim	4/64 (5,88%)	0,7332 (0,2473 – 2,1733)	0,8007
	Não	23/331 (4,85%)		
Dispneia	Sim	2/86 (2,33%)	0,2415 (0,0564 – 1,0348)	0,0382
	Não	28/284 (8,97%)		
Dor abdominal	Sim	1/29 (3,45%)	0,42 (0,0551 – 3,1988)	0,7123
	Não	29/370 (7,84%)		
Dor de garganta	Sim	11/119 (8,46%)	1,2114 (0,5586 – 2,627)	0,6865
	Não	19/268 (7,09%)		
Fadiga	Sim	9/108 (8,33%)	1,1688 (0,5178 – 2,6383)	0,6744
	Não	21/291 (7,22%)		
Febre	Sim	12/100 (12,00%)	2,1136 (0,9799 – 4,5593)	0,0772
	Não	18/297 (6,06%)		
Mialgia	Sim	15/138 (10,87%)	1,9919 (0,943 – 4,2073)	0,0745
	Não	15/260 (5,77%)		
Náusea	Sim	5/46 (10,87%)	1,5951 (0,5789 – 4,3955)	0,3705
	Não	25/352 (7,10%)		
Perda de peso	Sim	0/12 (0,00%)	0,0 (indefinido)	0,6117
	Não	30/386 (7,77%)		
Tosse	Sim	19/175 (10,86%)	2,3584 (1,0911 – 5,0975)	0,0342
	Não	11/224 (4,91%)		

Urticária	Sim	2/11 (18,18%)	2,8492 (0,587 – 13,829)	0,1977
	Não	28/387 (7,24%)		
Asma	Sim	0/26 (0,00%)	0,00 (indefinido)	0,2428
	Não	30/3740(8,02%)		
Diabetes	Sim	4/50 (8,00%)	1,0803 (0,3606 – 3,2358)	0,7795
	Não	26/349 (7,45%)		
Doença cardíaca	Sim	5/30 (16,67%)	2,79 (0,9731 – 7,8281)	0,0626
	Não	25/370 (6,76%)		
Doença imunológica	Sim	18/ (12,50%)	1,7882 (0,2127 – 15,0351)	0,4671
	Não	29/392 (7,40%)		
Doença hepática	Sim	1/3 (33,33%)	6,3448 (0,5585 – 72,0762)	0,2090
	Não	29/397 (7,30%)		
Doença renal	Sim	1/4 (25,00%)	4,2184 (0,4252 – 41,8473)	0,2688
	Não	29/396 (%7,32)		
Has	Sim	9/81 (11,11%)	1,7738 (0,7795 – 4,0363)	0,1636
	Não	21/319 (6,58%)		
Obesidade	Sim	1/39 (2,56%)	0,3004 (0,0398 – 2,2678)	0,3393
	Não	29/360 (8,06%)		
Tabagismo	Sim	1/54 (1,85%)	0,2056 (0,0274 – 1,5415)	0,1008
	Não	26/345 (8,41%)		

Tabela 2 – Análise univariada das variáveis explanatórias quantitativas e sua relação com o resultado da PCR para diagnóstico de infecção por SARS-COV-2, Jaboticabal, SP, 2020.

Variável	PCR	Média	Mediana	P
Idade (anos)	Positivos	42,90	39,5	0,7401
	Negativos	41,05	39,0	
Saturação (%)	Positivos	97,00	97,5	0,2139
	Negativos	96,37	97,0	
Pulso (nº batimentos)	Positivos	99,31	98	0,2686
	Negativos	95,67	94	
Temperatura (°C)	Positivos	36,52	36,4	0,3013
	Negativos	36,66	36,3	
Tempo sintomas (dias)	Positivos	4,93	5	0,9188
	Negativos	4,92	5	

Na análise de regressão logística múltipla foi possível obter um modelo com duas variáveis explanatórias significativas (Tabela 3). Esse modelo mostra que aqueles que apresentaram perda de olfato tiveram 2,64 vezes a chance de serem

positivos na PCR em relação aos que não apresentaram esse sintoma; mostra ainda que aqueles que apresentaram tosse tiveram 2,20 a chance de serem positivos em comparação com aqueles que não apresentaram.

Tabela 3 – Modelo logístico multivariável final das variáveis explanatórias associadas com o resultado da PCR para diagnóstico de infecção por SARS-COV-2, Jaboticabal, SP, 2020.

Variável explanatória	OR (IC 95%)	P
Perda olfato	2,6393 (1,1529 – 5,7898)	0,0174
Tosse	2,2022 (1,0248 – 4,9444)	0,0470
Significância geral do modelo		0,04303
Teste de Hosmer-Lemeshow de ajuste do modelo		1,00

6. DISCUSSÃO

Após a análise estatística dos dados foi possível concluir que os fatores pré-analíticos com influência significativa sobre os resultados dos exames de RT-PCR de protocolo alternativo realizados na presente pesquisa foram os sintomas “alteração de olfato e/ou paladar” e “tosse”. Cientistas e médicos de um grupo de pesquisa da Europa estudaram a alteração do olfato em 2.579 pacientes tratados ou internados em 18 hospitais, e observaram que 84% tinham sintomas leves, 5,6% moderados e 10,4% com sintomas severos a críticos. Do número total de pacientes, 74,2% apresentavam anosmia ou hiposmia (alteração de olfato), colocando este sintoma como o mais prevalente, à frente, por exemplo, da tosse, presente em 40 a 50% dos casos (Lechien JR et al., 2021). Tais dados corroboram aqueles analisados nesta pesquisa, uma vez que a variável "olfato" apresentou associação ligeiramente maior com o resultado positivo do que a variável "tosse".

O trabalho ainda mostrou haver relação entre o grau de gravidade da covid-19 e a alteração olfatória, pois tal sintoma estava presente em 85,9% dos casos leves e apenas 7% entre pacientes moderados, graves ou críticos (Lechien JR et al., 2021). O que foi confirmado por um estudo de meta-análise realizado pouco tempo depois, em que pacientes sem disfunção olfativa tiveram 5.3 vezes

mais hospitalizações, 7 vezes mais submissões a intubações ou ventilações e 7 vezes mais mortes (Goshtasbi K et al., 2021). Quanto à explicação para esta relação, a hipótese seria a de que, em pacientes de quadro leve, o vírus não passa da área do trato respiratório superior, alocando-se principalmente em mucosas olfatórias, gerando destruição de neurônios olfativos (Lechien JR et al., 2021). As causas de tais disfunções decorrentes da covid-19 estão ainda sendo investigadas, mas tudo aponta para a sequência lógica de que o epitélio olfatório da cavidade nasal apresente tropismo aumentado para a ligação do SARS-CoV-2, dado que as células desse local expressam grande quantidade de dois receptores importantes para a ligação e replicação do vírus: a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) e a serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2) (Butowt R e Bilinska K, 2020; Giacomelli A et al., 2020).

Os resultados de uma pesquisa conduzida no Instituto Pasteur na França corrobora estas hipóteses e adicionam mais uma preocupação ao controle de transmissão da doença: foi identificada, através de RT-qPCR de amostras citológicas, a presença do vírus em mucosa olfatória mesmo após a fase aguda da doença e resultados negativos de amostras nasofaríngeas de RT-qPCR (de Melo GD et al., 2021). Portanto, de acordo com os resultados da presente pesquisa e outras apontadas como embasamento científico, o sintoma denominado como “alteração de olfato/paladar” pode ser o único ou o primeiro sintoma a surgir ou a permanecer. Desta forma, deve-se utilizá-lo como um guia de suspeita diagnóstica, juntamente com o sintoma de “tosse”. Estes sintomas devem ser tratados como indicativos na triagem para pedido de exame diagnóstico e, em casos de distúrbio olfatório, para solicitar isolamento precoce e prolongado do paciente, enquanto persistirem os sintomas. O que reforça a conclusão de uma revisão narrativa sobre anosmia e disgeusia em pacientes com coronavírus, realizada em 2020 (de Carvalho Cardoso M et al., 2020).

O trabalho apresentou alguns achados não lógicos, como pacientes que apresentam dispneia terem menores chances de serem positivos, o que pode estar relacionado à qualidade do banco de dados e ao tamanho da amostra. É

importante ressaltar que houve orientação aos profissionais médicos e enfermeiros sobre a seleção de pacientes para a colheita de amostra de RT-PCR. Foi orientado que os 400 exames disponíveis fossem realizados em pacientes que estivessem dentro do período de sintomatologia adequado, conforme estudos já recomendavam. Apesar disto, foram colhidas amostras de pacientes com uma extensa faixa de tempo de sintomatologia: desde assintomáticos até pacientes com 17 dias de sintomas. A conduta escolhida por alguns profissionais médicos pode ter influenciado os resultados deste trabalho, de forma que a carga viral se apresenta baixa em pacientes fora do período de sintomatologia indicado para o exame.

O estudo realizado foi de grande importância local e regional, de forma a auxiliar no processo diagnóstico da covid-19 e em seu monitoramento epidemiológico na cidade de Jaboticabal, o que também influenciou positivamente no controle da doença na região. Além disso, o presente trabalho evidencia a importância de equipes multiprofissionais na área da saúde pública, dado que com a aplicação conjunta dos vastos conhecimentos das diferentes áreas de estudo, cria-se uma melhor e maior estrutura em vigilância epidemiológica.

7. CONCLUSÃO

A presente dissertação sugere uma alternativa válida a países com menor estrutura política e econômica, ao apresentar um protocolo alternativo de RT-PCR eficiente, com práticas de biossegurança e biosseguridade laboratoriais economicamente viáveis e sustentáveis. O protocolo surgiu como uma alternativa para o município de Jaboticabal, em um momento em que os laboratórios oficiais encontravam-se sobrecarregados. Apesar de ser um protocolo mais trabalhoso, possui uma ótima relação custo-benefício, apresentando resultados confiáveis. O trabalho contribuiu com a ciência e a sociedade brasileira ao utilizar um protocolo alternativo e de baixo custo de RT-PCR para covid-19 e evidenciar resultados similares a outros estudos que utilizaram RT-PCR convencional, sendo seu uso plausível, mesmo que em menor escala. A pandemia continua, novas variantes surgem e devem permanecer surgindo, e a aplicação do protocolo alternativo deve

ser adaptável conforme as mudanças que ocorrerem.

8. REFERÊNCIAS

Abdool Karim SS, de Oliveira T. (2021) New SARS-CoV-2 variants — clinical, public health, and vaccine implications. **N Engl J Med.**384(19):1866–8.

Agência Brasil. **Covid-19: Nova Zelândia enfrenta pior onda até agora.** Acessado em 06/10/2022. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/internacional/noticia/2022-02/covid-19-nova-zelandia-enfrenta-pior-onda-ate-agora>

Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W, Tao Q, Sun Z, Xia L. (2020) Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. **Radiology** **2020**, 200642.

Alfano V, Ercolano S. (2020)The Efficacy of Lockdown Against COVID-19: A Cross-Country Panel Analysis. **Appl Health Econ Health Policy.** 1-9.

Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. (2020) The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nat Med.** 26:450-2.

Baker M, Kvalsvig A, Verrall AJ, Telfar-Barnard L, Wilson N. (2020) New Zealand's elimination strategy for the COVID-19 pandemic and what is required to make it work. **N Z Med J.** 133(1512):10-14.

Bandyopadhyay G, Meltzer A. (2020)Let's Unite Against COVID-19 - A New Zealand Perspective. **Ir J Psychol Med.** May 14:1-10.

Barber-Lomax JW. (1964) Claude Bourgelat. **Journal of Small Animal Practice**, 5(1), 3-4.

Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. (2003) Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172–4177.

Brasil. Ministério da Saúde (2020)c **Boletim Epidemiológico Número 07. Especial: Doença pelo Coronavírus 2019.** Acesso em 08/06/2020. Disponível em: <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/April/06/2020-04-06---BE7---Boletim-Especial-do-COE---Atualizacao-da-Avaliacao-de-Risco.pdf>

Burki T. (2021) Understanding variants of SARS-CoV-2. **The Lancet**, 397(10273), 462.

Butowt R, & Bilinska K. (2020) SARS-CoV-2: olfaction, brain infection, and the urgent need for clinical samples allowing earlier virus detection. **ACS chemical neuroscience**, 11(9), 1200-1203.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. **Division of Viral Diseases**. 2020 Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>

CEBM, 2020. Centre for Evidence-Based Medicine: SARS-CoV-2 viral load and the severity of COVID-19. Disponível em: <https://www.cebm.net/covid-19/sars-cov-2-viral-load-and-the-severity-of-covid-19/>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)a. **2019 Novel Coronavirus - Symptoms**. Acessado em 08/06/2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/about/symptoms.html>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)b. **COVID-19 Pandemic Planning Scenarios**. Acessado em 09/06/2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/planning-scenarios.html>

Centers of Disease Control Prevention (CDCc). **CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel**; Division of Viral Diseases, U.S. Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, 2020.

Centers of Disease Control Prevention (CDCd). (2020) **Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing**. Acessado em 09/06/2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>

Chen J. (2020) Pathogenicity and transmissibility of SARS-CoV-2 quick overview and comparison with other emerging viruses. **Microbes and Infection**, 22 (2), 69-71.

CNSPV/CFMV – Comissão Nacional de Saúde Pública Veterinário do Conselho Federal de Medicina Veterinária. O Médico Veterinário, a Estratégia de Saúde da Família e o Nasf. **Revista CFMV**, N. 48,p. 9-14,2009.

Corman V M, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D KW, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DGJC, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MPG, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time. RT-PCR. **Euro Surveill**, v.25, 2020. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

Corman V, Bleicker T, Brünink S, Zambon M. (2020) Diagnostic Detection of Wuhan Coronavirus 2019 by Real-Time RT-PCR; **World Health Organization: Geneva, 2020**.

Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, Bleicker T, ... & Drosten C. (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time. RT-PCR. **Euro Surveill**, v.25.

Costa, Nilson do Rosário et al. A capacidade institucional do Setor Saúde e a resposta à COVID-19 em perspectiva global. **Ciência & Saúde Coletiva**. 2021, v. 26, n. 10, pp. 4645-4654.

Cui J, Li F, Shi-Li Z. (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nat Rev Microbiol**. 17(3):181-92.

Dantas, F. (2020) **Coleta sistemática e prospectiva de dados em pacientes na fase inicial de COVID-19: Protocolo para tratamento individualizado e avaliação de resultados terapêuticos**. Acessado em 17/10/2020. Disponível em: https://amhb.org.br/wp-content/uploads/2020/08/Dantas-F_Coleta-sistem%C3%A1tica-e-prospectiva-de-dados-em-pacientes-na-fase-inicial-de-COVID-191.pdf

de Carvalho Cardoso M, Guimarães LS, de Andrade IJM, Silva AHG, Souza GC, Castro L AM, ... & Zanuncio AV. (2020) Anosmia e disgeusia no paciente com coronavírus: revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, (46), e4226-e4226.

de Melo GD, Lazarini F, Levallois S, Hautefort C, Michel V, Larrous F, ... & Lledo PM. (2021) COVID-19–related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. **Science Translational Medicine**, 13(596).

de Melo RT, Rossi DA, Monteiro GP and Fernandez H. (2020) Veterinarians and One Health in the Fight Against Zoonoses Such as COVID-19. **Front. Vet. Sci**. 7:576262.

Druce J, Garcia K, Tran T, Papadakis G, Birch C. (2012) Evaluation of swabs, transport media, and specimen transport conditions for optimal detection of viruses by PCR. **J ClinMicrobiol** 50:1064 –1065.

Du RH, Liang LR, Yang CQ, Wang W, Cao TZ, Li M, et al. (2020) Predictors of mortality for patients with COVID-19 Pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. **EurRespir J**.

Duczmal LH et al.(2020)Vertical social distancing policy is ineffective to contain the COVID-19 pandemic. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, e00084420.

Evans BR & Leighton FA. (2014) A history of One Health. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, 33(2), 413-420.

Fan Huahao et al. (2022) "The emergence of powerful oral anti-COVID-19 drugs in the post-vaccine era." **The Lancet Microbe** 3.2 : e91.

Faria NR et al. (2021) Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. **Virological**, 372, 815-821.

Fenollar F, Bouam A, Ballouche M, Fuster L, Prudent E, Colson P et al. (2021) Evaluation of the Panbio COVID-19 rapid antigen detection test device for the screening of patients with COVID-19. **J Clin Microbiol.**;59(2):e02589-20.

Foddai, A., Lubroth, J., & Ellis-Iversen, J. (2020). Base protocol for real time active random surveillance of coronavirus disease (COVID-19)–Adapting veterinary methodology to public health. **One Health**, 100129.

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. (1999) Quantitative RTPCR: Pitfalls and Potential. **BioTechniques** 1999, 26 (1), 124–125.

G1 Ribeirão Preto e Franca. **Centro 24h é implantado para atender moradores com sintomas de coronavírus em Jaboticabal, SP**. Acessado em 19/10/2020. Disponível em: <https://g1.globo.com/sp/ribeirao-preto-franca/noticia/2020/03/29/centro-24-h-e-implantado-para-atender-moradores-com-sintomas-de-gripe-em-jaboticabal-sp.ghtml>.

Giacomelli A, Pezzati L, Conti F, Bernacchia D, Siano M, Oreni L, ... & Galli M. (2020) Self-reported olfactory and taste disorders in patients with severe acute respiratory coronavirus 2 infection: a cross-sectional study. **Clinical Infectious Diseases**, 71(15), 889-890.

Gibbs SEJ, Gibbs PJ. (2012) The historical, present, and future role of veterinarians in one health. **Curr Top Microbiol Immunol** . 365:31–47.

Gire SK et al. (2014) Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. **Science**. 345:1369-72.

Goshtasbi K, Pang J, Lehrich BM, Vasudev M, Birkenbeuel JL, Abiri A, & Kuan EC. (2021) Association Between Olfactory Dysfunction and Critical Illness and Mortality in COVID-19: A Meta-analysis. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, 01945998211017442.

Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, et al. (2020) Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUS of the Lombardy Region, Italy. **JAMA**. 323(16):1574-1581.

Hamming I, Timens W, Bulthuis ML, Lely AT, Navis G, van Goor H. (2004) Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **J Pathol**. 203:631–637.

Han Y & Yang H. (2020). The transmission and diagnosis of 2019 novel coronavirus infection disease (COVID-19): A Chinese perspective. **Journal of Medical Virology**, 1-6.

He X, Lau EHY, Wu P et al. (2020) Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nat Med** **26**, 672–675.

Hodcroft EB. (2022) SARS-CoV-2 Mutations and Variants of Interest. **CoVariants**. Available online: <https://covariants.org/>

Hofmann, M.A., Thur, B.; Liu, L.; Gerber, M.; Stettler, P.; Moser, C., Bossy, S. Rescue of infectious classical swine fever and foot-and-mouth disease virus by RNA transfection and virus detection by RT-PCR after extended storage of samples in Trizol®. **Journal of Virological Methods**, v. 87, p. 29-39, 2000.

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu, X et al. (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet (Lond. Engl.)** 395, 497–506.

Jesus JG et al. (2020) Importation and early local transmission of COVID-19 in Brazil, 2020. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 62, e30

Johns Hopkins University and Medicine. New Zealand. Acessado em: 17/10/2022. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/region/new-zealand>

Jones NR, Qureshi ZU, Temple RJ, Larwood JP, Greenhalgh T & Bourouiba L. (2020). Two metres or one: what is the evidence for physical distancing in covid-19?. **bmj**, 370.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. (2003) Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 41 (4), 1548–1557.

Kahn LH. (2006) Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. **Emerg. Infect. Dis.**, 12, pp. 556-561

Khan S et al. (2020). The emergence of a novel coronavirus (SARS-CoV-2), their biology and therapeutic options. **Journal of Clinical Microbiology**.

KK To, OT Tsang, WS Leung, ARTam, TC Wu, DC Lung, CC Yip, JP Cai, JM Chan, TSChik, et al. (2020) Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. **Lancet. Infect. Dis**.

Kochel, T.; Kocher, G.A.; Ksiazek, T.G.; Burans, J.P. Evaluation of TRIzol LS Inactivation of Viruses. **Journal of ABSA International**, v. 22, p. 52-55, 2017. DOI: 10.1177/1535676017713739

Kringos DS, Boerma W, Zee J, Groenewegen P. (2013) Europe's strong primary care systems are linked to better population health but also to higher health spending. **Health Aff (Millwood)**.32(4):686-94.

Kupferschmid K. (2021) Where did 'weird' Omicron come from? **Science**.374(6572):1179.

Lechien JR, Chiesa-Estomba CM, Vaira LA, De Riu G, Cammaroto G, Chekkoury-Idrissi Y, ... & Saussez S. (2021) Epidemiological, otolaryngological, olfactory and gustatory outcomes according to the severity of COVID-19: a study of 2579 patients. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, 1-9.

Leroy EM, Ar Gouilh M, Brugère-Picoux J. (2020) The risk of SARS-CoV-2 transmission to pets and other wild and domestic animals strongly mandates a one-health strategy to control the COVID-19 pandemic. **One Health**. 100133:100133

Liang W, Guan W, Chen R, Wang W, Li J, Xu K, et al. (2020) Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. **Lancet Oncol**.21(3):335-7.

Lopez-Leon S et al. (2021) More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep** 11, 16144.

Matsuda EM, Campos IB, Oliveira IP, Colpas DR, Carmo AMS, Brígido LFM. (2021) Field evaluation of COVID-19 antigen tests versus RNA based detection: Potential lower sensitivity compensated by immediate results, technical simplicity, and low cost. **J Med Virol**. 1– 6.

Mattar S & González M. (2018) Zoonotic emergence of coronavirus: a potential public risk for Latin America. **Rev MVZ Cordoba**. 23(3):6775-7.

McIntosh K, Hirsch MS, Bloom AJLID (2020) Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, virology, and prevention. **Lancet. Infect. Dis**, 1, 2019-2020.

Ministério da Economia (BR). (2020)**Brazil's policy responses to COVID- 19**. Acessado em: 08/06/2020. Disponível em: <https://www.gov.br/economia/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-em-outros-idiomas/covid-19/brazil2019s-policy-responses-to-covid-19>

Ministério da Saúde (2011). Diário Oficial da União. (2011)**Redefine e amplia o Programa Telessaúde Brasil, que passa a ser denominado Programa Nacional Telessaúde Brasil Redes (Telessaúde Brasil Redes)**. Portaria GM/MS No 2.546, de 27 de outubro de 2011.

Ministério da Saúde (2020)a **Coronavírus: 25 mortes e 1.546 casos confirmados**. Acesso em 26/05/2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46573-coronavirus-25-mortes-e-1-546-casos-confirmados>.

Ministério da Saúde (2020)b **Notificação de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19)**. Acesso em 28/05/2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/component/content/article/34-page/9895-coronav%C3%ADrus.html?highlight=WyJjb3JvbmF2XHUwMGVkcVzII0=&It>

Ministério da Saúde do Brasil (MS). **Protocolo de Manejo Clínico para o Novo Coronavírus (2019-nCoV)**. Acessado em 08/06/2020. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/11/protocolo-manejo-coronavirus.pdf>

Monath TP, Kahn LH, Kaplan B. (2010) Introduction: One Health perspective. **ILAR. J** 51(3):193–198

Moore JP, Offit PA. (2021) SARS-CoV-2 Vaccines and the Growing Threat of Viral Variants. **JAMA**.

Naveca F, Nascimento V, Souza V, Corado A, Nascimento F, Silva G, ... & Bello G. (2021). COVID-19 epidemic in the Brazilian state of Amazonas was driven by long-term persistence of endemic SARS-CoV-2 lineages and the recent emergence of the new Variant of Concern P. 1.

Notícias UOL, BBC News Brasil em Londres. Covid: Variante acelera intubação de jovens e SP orienta procurar ajuda no 1º dia de sintomas. Acessado em 19/04/2021. Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/ultimas-noticias/bbc/2021/04/19/covid-variante-variante-sao-paulo-intubacao-jovens-coronavirus.htm>

Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. (2020) The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) – China. **Zhonghua Liu Xing Bing XueZaZhi**. 41(2):145-51. Chinese.

Oliveira AC, Lucas TC, Iquiapaza RA. (2020) What has the COVID-19 pandemic taught us about adopting preventive measures?. **Texto contexto - enferm.**, Florianópolis, v. 29, e20200106.

Organização Pan-Americana Saúde – OPAS. (2018) **30 Anos de que para 2030?** Brasília, DF: OPAS; Acessado em: 08/06/2020. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49663/9789275720448_p or.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Osofsky SA, S. Cleaveland S, Karesh WB, Kock MD, Nyhus PJ, Starr L, Yang (Eds.) A. (2005) Conservation and Development Interventions at the Wildlife/Livestock Interface: Implications for Wildlife, Livestock and Human Health. **Forum**. Switzerland/Cambridge, UK.

Ozili PK, Arun T. Spillover of COVID-19: impact on the Global Economy. Disponível em **SSRN** 3562570. 2020
Pacheco TJA, Silva VCMD & Souza DGD (2020). Nano COVID-19 Vaccines: the firsts RNA lipid nanoparticle vaccines being approved from history.

Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. (2020) Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. **Lancet Infect Dis**, 24:30113–30114.

Park DJ et al. (2015) Ebola virus epidemiology, transmission, and evolution during seven months in Sierra Leone. **Cell**. 161:1516-26.

Park, M.; Won, J.; Choi, B. Y.; Justin Lee, C. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. **Experimental & Molecular Medicine** volume 52, pages963–977 (2020).

Rezende LFM et al.(2020) Adults at high-risk of severe coronavirus disease-2019 (Covid-19) in Brazil. **Rev. SaúdePública**, São Paulo, v. 54, 50.

Rodriguez-Morales AJ, Bonilla-Aldana DK, Balbin-Ramon GJ, Rabaan AA, Sah R, Paniz-Mondolfi A. (2020) History is repeating itself: a probable zoonotic spillover as a cause of an epidemic: the case of 2019 novel coronavirus. **Infez Med**. 28(1):3-5.

Sah P, Fitzpatrick MC, Zimmer CF, Abdollahi E, Juden-Kelly L, Moghadas SM, ... & Galvani AP. (2021) Asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A systematic review and meta-analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 118(34).

Santos JPC et al. (2020) Vulnerabilidade a formas graves de COVID-19: uma análise intramunicipal na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, e00075720.

Schoy A, Anantharajah A, Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Verroken A, & Rodriguez-Villalobos H. (2020). Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. **Journal of Clinical Virology**, 129, 104455.

Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. (2020) Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. **JAMA - J Am Med Assoc**. 2019:2019–21.

Sheikh A, McMenamin J, Taylor B, Robertson C. (2021) SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: Demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness. **Lancet**, 397, 2461–2462.

Silva ALO, Moreira JC, Martins SR. (2020) COVID-19 e tabagismo: uma relação de risco. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, e00072020.

Sousa MRN et al. (2020) Pathogenesis and treatment prospects for Covid-19: a review. **Research, Society and Development**, Itabira, v. 9, n. 7, p. e05973730.

Souza, CDF et al.(2020)The need to strengthen Primary Health Care in Brazil in the context of the COVID-19 pandemic. **Braz. oral res.**, São Paulo , v. 34, e047.

Steele, Sandra G., Jenny-Ann LML Toribio, Siobhan M. (2021) "Global health security must embrace a One Health approach: Contributions and experiences of veterinarians during the COVID-19 response in Australia." **One Health**. 100314.

Sudre CH, Lee KA, Lochlainn MN, Varsavsky T, Murray B, Graham MS, Menni C, Modat M, Bowyer R, Nguyen LH, Drew DA, Joshi AD, Ma W, Guo CG, Lo CH, Ganesh S, Buwe A, Pujol JC, du Cadet JL, Visconti A, ... Ourselin S. (2021) Symptom clusters in COVID-19: A potential clinical prediction tool from the COVID Symptom Study app. **Science advances**, 7(12), eabd4177.

Takeuchi Y, Akashi Y, Kato D, Kuwahara M, Muramatsu S, Ueda A, Notake S, Nakamura K, Ishikawa H, & Suzuki H. (2021). The evaluation of a newly developed antigen test (QuickNavi™-COVID19 Ag) for SARS-CoV-2: A prospective observational study in Japan. *Journal of infection and chemotherapy : Official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 27(6), 890–894.

Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. (2020) Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. **Journal of clinical microbiology**, 58(6), e00512-20.

UNEP (2016). UNEP Frontiers 2016 Report: Emerging Issues of Environmental Concern. **United Nations Environment Programme**, Nairobi.

United Nations Environment Programme and International Livestock Research Institute (2020). Preventing the Next Pandemic: Zoonotic diseases and how to break the chain of transmission. Nairobi, Kenya.

Verotti MP, Ramos MC, Henriques CMP, Elias FTS & Camargo EB. (2020) Testes diagnósticos para Covid-19 registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária: sensibilidade e especificidade reportadas pelos fabricantes.

Waltner-Toews D. Zoonoses, One Health and complexity: wicked problems and constructive conflict. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. 2017;372(1725):20160171.

Wang D, Hu B, Hu C, Zu F, Liu X, Zhang J, et al. (2020) Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**. 323(11):1061-9.

Wang P et al. (2021) Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variants B. 1.351 and B. 1.1. 7 to Antibody Neutralization. **bioRxiv**.

Wei Pei-Fang. (2020) Diagnosis and Treatment Protocol for Novel Coronavirus Pneumonia (Trial Version 7), **Chinese Medical Journal**: May 5, 2020 - Volume 133 - Issue 9 - p 1087-1095.

Werneck GL, Carvalho MS.(2020)A pandemia de COVID-19 no Brasil: crônica de uma crise sanitária anunciada. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 5, e00068820.

World Health Organization (2020)a **Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020**. Acesso em: 26/05/2020. Disponível em: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.

World Health Organization (2020)b **Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic**. Acesso em 26/05/2020. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.

World Health Organization (2020)d. **Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected**. Interim guidance 13 March 2020.

World Health Organization (2020)e. Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines. Acesso em: 24/03/2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>.

World Health Organization (2020)f. (2020)**Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19**. Interim guidance. Acessado em 10/06/2020. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID19-lab_testing-2020.1-eng.pdf.

World Health Organization (2021)a. Enhancing readiness for Omicron (B.1.1.529): technical brief and priority actions for member states. Acesso em: 23/03/2022. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/technical-brief-and-priority-action-on-omicron.pdf?sfvrsn=50732953_3.

World Health Organization (2021)b. B.1.1.529. Acesso em: 24/03/2022. Disponível em: https://cov-lineages.org/global_report_B.1.1.529.html.

Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. (2020)Cryo-EM Structure of the 2019-nCoV Spike in the Prefusion Conformation. **bioRxiv**.

Wu F et al. (2020) Complete genome characterisation of a novel coronavirus associated with severe human respiratory disease in Wuhan, China. **bioRxiv**.

Wu Z, McGoogan JM. (2020) Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**.

X Hu, Y Xing, J Jia, W Ni, J Liang, D Zhao, X Song, R Gao, F Jiang. (2020) Factors associated with negative conversion of viral RNA in patients hospitalized with COVID-19. **Sci. Total Environ.**, 728, p. 138812

Yoo HS & Yoo D. (2020) COVID-19 and veterinarians for one health, zoonotic and reverse-zoonotic transmissions. **J Vet Sci**. 21(3):e51.

Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**. 382(8):727-733.

Zinsstag J, Schelling E, Waltner-Toews D, Tanner M. (2011) From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. **Preventive Veterinary Medicine**, Volume 101, Issues 3–4, Pages 148-156, ISSN 0167-5877.

Zinsstag J, Schelling E, Bonfoh B, Fooks AR, Kasymbekov J, Waltner-Toews D, Tanner M. (2009) Towards a “one health” research and application tool box. **Vet. Ital.**, 45, pp. 121-133

Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, Yu J, Kang M, Song Y, Xia J, Guo Q, Song T, He J, Yen HL, Peiris M, Wu J. (2020) SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. **N Engl J Med** 382:1177–1179.