

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS  
INFECCIOSAS**

**RENATA ALVES BARCELOS DIAS**

**FREQUÊNCIA E IMPACTO DA DETECÇÃO DE  
ANTICORPOS NAS MICOSES DE  
ACOMETIMENTO PULMONAR EM PACIENTES COM  
COVID-19**

Rio de Janeiro  
2022

RENATA ALVES BARCELOS DIAS

**FREQUÊNCIA E IMPACTO DA DETECÇÃO DE  
ANTICORPOS NAS MICOSES DE  
ACOMETIMENTO PULMONAR EM PACIENTES COM  
COVID-19**

Dissertação apresentada ao Curso de Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosely Maria Zancopé Oliveira

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Marcos de Abreu Almeida

Rio de Janeiro  
2022

Dedico esta dissertação ao meu filho  
Julio César e ao meu avô Custódio  
Lourenço Dias (In memoriam) por me  
mostrarem o maior amor que existe.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus por todas as oportunidades que tive na vida e por me proteger todos os dias. Obrigada pai celestial.

A toda minha família, meus pais, minha irmã, meu marido e meu filho por me apoiarem e confiarem em mim, por me darem todo o suporte para que eu chegasse até aqui.

À Dra Rosely Maria Zancopé Oliveira, minha orientadora, pela oportunidade dada, sem nem ao menos me conhecer pessoalmente, estávamos em plena pandemia e ela me confiou seu nome, seu trabalho e sua dedicação. Obrigada mãe científica.

Um agradecimento especial ao meu coorientador Marcos de Abreu Almeida, por ser essa pessoa acolhedora, prestativa e de enorme coração que me acolheu e sempre esteve disposto a me ensinar e ajudar, muito obrigada Marcos, você é muito especial pra mim.

À Dra Andrea Engemann, por suas colocações brilhantes, sugestões e colaboração no decorrer da realização deste trabalho.

À Dra Cláudia Vera Pizzini, pela disponibilidade e valiosa colaboração na realização da revisão desta dissertação.

Ao Dr Rodrigo de Almeida Paes, por sempre estar à disposição para ajudar e tirar minhas dúvidas e por ter aceitado fazer parte da Banca Examinadora.

Á Dr Marcela por aceitar fazer parte dessa banca e contribuir com seus nobres conhecimentos para o meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório, por toda parceria, apoio, os cafézinhos das 15 h, festinhas de aniversário surpresa. E um agradecimento especial a Rosângela, a Rô, que me deu um grande incentivo no início do mestrado, diante de um desespero meu, e ela falou: “VAI, VOCÊ CONSEGUE” e consegui Rô, cheguei ao final.

Ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas, pelo apoio e ensinamentos.

Ao CNPq, à FAPERJ e ao CAPES, pelo suporte financeiro deste projeto.

Enfim, a todos que fizeram parte direta ou indiretamente da construção do meu título de mestre!

“A persistência é o menor caminho do êxito”  
Charles Chaplin

Dias, R.A.B. **Frequência e impacto da detecção de anticorpos nas micoses de acometimento pulmonar em pacientes com COVID-19.** Rio de Janeiro, 2022. 92f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

## RESUMO

Infecções fúngicas foram relatadas em pacientes com COVID-19, especialmente histoplasmose, paracoccidioidomicose, aspergilose e candidíase. O diagnóstico adequado associado a um tratamento eficaz das coinfeções fúngicas pode levar à redução da mortalidade desses pacientes. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta de anticorpos em pacientes adultos com COVID-19 internados (INI-FIOCRUZ), de setembro de 2020 a fevereiro de 2021, contra *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* e avaliar a frequência e a detecção de anticorpos tem um papel na evolução clínica dos pacientes. A imunodifusão dupla (ID) foi utilizada para pesquisa de anticorpos contra *Aspergillus*, *H. capsulatum* e *P. brasiliensis*. Além disso, o Western blot (WB) também foi usado para detectar anticorpos anti-*H. capsulatum* e kits comerciais de ELISA para detecção de anticorpos anti-*Aspergillus* e anti-*Candida* em amostras de soro de 346 pacientes. Sete amostras apresentaram anticorpos anti-*Histoplasma* na técnica de ID e 45 na WB. Os testes ELISA detectaram anticorpos anti-*Candida* em 115 amostras. A ID não revelou anticorpos anti-*Aspergillus*, mas o ELISA detectou um paciente com níveis detectáveis de anticorpos anti-*Aspergillus*. Quando avaliado o sexo dos pacientes positivos para detecção de anticorpos anti-*Histoplasma*, foi observada a predominância do sexo masculino ( $P$ -valor=0,0131) e o sexo predominante nos reagentes para anticorpos anti-*Candida* foi o sexo feminino ( $P$ -valor= 0,0029). A variável idade não revelou diferença e nem significância estatística em nenhum dos grupos, reagentes para anticorpos anti-*Histoplasma* com  $P$ -valor= 0,1348 e reagentes anti-*Candida*,  $P$ -valor= 0,1467. As curvas de sobrevivência mostraram maior mortalidade em pacientes com anticorpos anti-*Candida* ( $P$ -valor=0,0002), mas não em pacientes com anticorpos anti-*H. Capsulatum* ( $P$ -valor=0,0953). Nossos resultados mostram que a detecção precoce de anticorpos anti-*Candida* pode indicar um prognóstico ruim para os pacientes, proporcionando condutas e tratamento clínico apropriados.

**Palavras chave:** Micoses sistêmicas; oportunistas; COVID-19; Anticorpos; sorologia; diagnósticos.

Dias, R.A.B. **Frequency and impact of antibodies detection in pulmonary mycoses in patients with COVID-19.** Rio de Janeiro, 2022. 92f. Dissertation [Science Dissertation in Clinic Research in Infection Diseases] — Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

## ABSTRACT

Fungal infections have been reported in patients with COVID-19, especially histoplasmosis, paracoccidioidomycosis, aspergillosis, and candidiasis. Proper diagnosis associated with effective treatment of fungal co-infections can lead to reduced mortality in these patients. The aim of this study was to evaluate the antibody response in hospitalized adult patients with COVID-19 (INI-FIOCRUZ), from September 2020 to February 2021, against *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Histoplasma capsulatum* and *Paracoccidioides brasiliensis* and to evaluate the frequency and whether antibody detection plays a role in the clinical outcome of patients. Double immunodiffusion (ID) was used to search for antibodies against *Aspergillus*, *H. capsulatum* and *P. brasiliensis*. In addition, Western blot (WB) was also used to detect anti-*H. capsulatum* and commercial ELISA kits for detecting anti-*Aspergillus* and anti-*Candida* antibodies in serum samples from 346 patients. Seven samples showed anti-*Histoplasma* antibodies in the ID technique and 45 in the WB technique. ELISA tests detected anti-*Candida* antibodies in 115 samples. ID did not reveal anti-*Aspergillus* antibodies, but the ELISA did detect one patient with detectable levels of anti-*Aspergillus* antibodies. When assessing the sex of patients positive for detection of anti-*Histoplasma* antibodies, a predominance of males was observed ( $P$ -value=0.0131) and the predominant gender in reagents for anti-*Candida* antibodies was female ( $P$ -value = 0.0029). The age variable showed no difference or statistical significance in any of the groups, reagents for anti-*Histoplasma* antibodies with  $P$ -value= 0.1348 and anti-*Candida* reagents,  $P$ -value= 0.1467. Survival curves showed higher mortality in patients with anti-*Candida* antibodies ( $P$ -value=0.0002), but not in patients with anti-*H. Capsulatum* ( $P$ -value=0.0953). Our results show that the early detection of anti-*Candida* antibodies may indicate a poor prognosis for patients, providing appropriate conduct and clinical treatment.

**Keywords:** Systemic mycoses; opportunists; COVID-19; Antibodies; serology; diagnoses.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Áreas geográficas de casos de micoses endêmicas com COVID 19.....	24
<b>Figura 2:</b> Características Macro e micromorfológica da paracoccidiodomicose....	25
<b>Figura 3:</b> Distribuição geográfica da paracoccidiodomicose.....	27
<b>Figura 4:</b> Agente <i>Histoplasma capsulatum</i> .....	29
<b>Figura 5:</b> Características do crescimento das colônias do gênero <i>Candida</i> em meio cromogênico .....	32
<b>Figura 6:</b> Características micromorfológicas de leveduras do gênero <i>Candida</i> em AgarFubá.....	33
<b>Figura 7:</b> Características Macro e micromorfológica de <i>Aspergillus fumigattus</i> .....	36
<b>Figura 8:</b> Esquema da técnica de ID.....	50
<b>Figura 9:</b> Lâmina usada no teste de ID.....	57
<b>Figura 10:</b> Tiras de membrana de nitrocelulose do teste de WB.....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características clínicas dos pacientes testados para detecção de anticorpos anti- <i>Histoplasma</i> .....	60
<b>Tabela 2:</b> Características clínicas dos pacientes com Western blott positivos .....	64
<b>Tabela 3:</b> Características clínicas dos pacientes testados para detecção de anticorpos anti- <i>Candida</i> .....	67

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Distribuição da variável do sexo dos pacientes testados para detecção de anticorpos anti- <i>Histoplasma</i> por <i>Western blot</i> .....	59
<b>Gráfico 2:</b> Distribuição da variável do sexo dos pacientes reagentes para detecção de anticorpos anti- <i>Histoplasma</i> por <i>Western blot</i> .....	61
<b>Gráfico 3:</b> Curva de sobrevida anti- <i>Histoplasma</i> .....	62
<b>Gráfico 4:</b> Curva de sobrevida em anti- <i>Histoplasma</i> positivos.....	63
<b>Gráfico 5:</b> Distribuição da variável do sexo dos pacientes reagentes para detecção de anticorpos anti- <i>Candida</i> por <i>ELISA</i> .....	68
<b>Gráfico 6:</b> Curva de sobrevida anti- <i>Candida</i> .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABPA - Aspergilose bronco pulmonar alérgica
- AI - Aspergilose pulmonar invasiva
- BCIP - Fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*)
- BHI — Infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion*)
- CAPA - Aspergilose pulmonar associada à COVID-19
- CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
- CF- Fixação do complemento
- COE- Centro de Operações de Emergência
- CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- DO — Densidade óptica
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- EIA - Imunoensaio enzimático
- EORT/MSG - *Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group - Consensus Group.*
- Gp43 - glicoproteína com peso molecular de 43 kDa
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana adquirida (*Human Immunodeficiency Virus*)
- HMIN - Histoplasmina
- HMIN-P - Histoplasmina purificada
- HMIN-PT - Histoplasmina purificada e deglicosilada
- INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- IAPA - Aspergilose pulmonar associada à Influenza
- ID - Imunodifusão de dupla
- IL - Interleucina
- IPA - Aspergilose invasiva provável
- IgG - Imunoglobulina da classe G
- IgM - Imunoglobulina da classe M
- INI - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- KDa - *kilodalton*
- IL-6 - Interleucina-6
- LBA - Lavado bronco alveolar
- mAb - Anticorpo monoclonal

ME - Micoses endêmicas

MERS - Síndrome respiratória do Oriente Médio MS - Ministério da Saúde

NBT - Azul de nitro tetrazolio (*nitro blue tetrazolium*) OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão salina fosfato (*Phosphate buffer saline*) PCM - Paracoccidioidomicose

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*) PM - Peso molecular

PHEIC - Emergência de saúde pública internacional PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões RNA - Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RT-PCR - Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da

polimerase RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa em

tempo real SARS - Síndrome respiratória aguda grave

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS).

TBS - Salina tamponada com Tris (*Tris buffer saline*)

TBS-T - Salina tamponada com Tris, acrescida de *Tween 20*

TBS-TL - Salina tamponada com Tris, acrescida de *Tween 20* e leite desnatado

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UTI - Unidade de terapia intensiva WB - *Western blot*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. COVID-19: HISTÓRICO.....	15
1.2. Epidemiologia .....	17
1.3. Manifestações clínicas da COVID-19.....	18
1.4. Diagnóstico da COVID-19.....	19
1.5. Infecções fúngicas e COVID 19 .....	21
1.5.1. Paracoccidiodomicose.....	25
1.5.2. Histoplasnose.....	28
1.5.3. Candidíase .....	31
1.5.4. Aspergilose .....	35
1.6. Diagnóstico das infecções fúngicas.....	39
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	42
3.1. Objetivo geral.....	42
3.2. Objetivos específicos .....	42
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	43
4.1. População de estudo .....	43
4.2. Procedimentos para coleta de amostras biológicas e registros dos pacientes. ....	43
4.3. Definição de casos.....	44
4.4. Antígenos.....	44
4.4.1. Produção do antígeno filtrado de <i>P. brasiliensis</i> .....	45
4.4.2. Produção do antígeno filtrado de <i>A. fumigatus</i> .....	46
4.4.3. Produção do antígeno histoplasmina (HMIN) .....	46

4.4.3.1. Purificação da hmin por cromatografia de troca catiônica e deglicosilação pelo NaIO <sub>4</sub> .....	48
4.4.4 Dosagem de proteínas.....	49
4.5. IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA DE OUCHTERLONY.....	49
4.6. Métodos Imunoenzimáticos.....	50
4.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	50
4.6.2 <i>Western blot</i> .....	51
4.6.3 ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Aspergillus</i> .....	52
4.6.4. ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Candida</i> .....	53
4.7. Plano de análise estatística.....	54
4.8. Considerações éticas.....	55
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
5.1. ANTÍGENOS.....	56
5.2. IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA (ID).....	56
5.3. MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS.....	57
5.3.1. <i>Western blot</i> para detecção de anticorpos anti- <i>Histoplasma</i> .....	57
5.4. Avaliação de desempenho do <i>Western blot</i> .....	59
5.5. ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Aspergillus</i> .....	65
5.6. ELISA para detecção de anticorpos anti- <i>Candida</i> .....	65
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>77</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. COVID-19: HISTÓRICO

Coronavírus são vírus de RNA (ácido ribonucleico) de fita simples com sentido positivo que são responsáveis por causar infecções respiratórias em uma variedade de animais, incluindo aves e mamíferos (LANA et al., 2020). O nome coronavírus provém do latim, corona, que significa coroa devido à sua morfologia, observada por microscopia eletrônica (TYRREL em 1968 Apud HABAS et al., 2020). A família dos coronavírus já vem sendo citada e estudada há mais de 50 anos, e infecta várias espécies animais incluindo humanos (WEISS et al., 2005). Contudo, os estudos acerca de seus mecanismos de replicação e de patogenicidade só foram iniciados na década de 1970, pois até então não havia relatos de doenças em humanos causadas por estes vírus. O cenário mudou, quando em 2003, emergiu a epidemia de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), na qual se comprovou a infecção por coronavírus, tornando um motivo de preocupação na saúde pública e aumentando a necessidade de pesquisas deste agente (WEISS et al., 2005). Emergente nos últimos anos, a COVID-19 (doença do coronavírus - 2019) é causada pelo SARS-CoV-2, e tem como um dos principais sintomas a síndrome respiratória aguda grave (HABAS et al., 2020).

Sete coronavírus foram reconhecidos como patógenos em humanos nos últimos 20 anos, dois deles foram responsáveis pelas epidemias mais virulentas de síndrome respiratória aguda grave: a epidemia de SARS que emergiu em Hong Kong (China), em 2003, e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) que surgiu na Arábia Saudita em 2012. Ambas fazem parte da lista de doenças prioritárias para pesquisa e desenvolvimento no contexto de emergência (LANA et al., 2020).

O novo coronavírus, denominado SARS-CoV-2, causador da COVID-19, foi detectado em 31 de dezembro de 2019 em Wuhan, na China (RUAN et al., 2020). Em 9 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) confirmou a circulação do novo coronavírus na China.

No dia seguinte, pesquisadores chineses publicaram o primeiro sequenciamento genético do vírus SARS-CoV-2.

E em 21 de janeiro de 2020, os Estados Unidos reportaram seu primeiro caso da doença (OMS 2020, 29 de janeiro).

Por conta da disseminação a nível mundial, em janeiro de 2020 a OMS declarou a COVID-19 como uma emergência de saúde pública internacional (PHEIC) de grande impacto e nomeou a doença como COVID-19 (LORENZ et al., 2021).

O sequenciamento genômico e a análise filogenética indicaram tratar-se de um beta-coronavírus, do mesmo subgênero do agente da síndrome da insuficiência respiratória aguda grave (SARS) que causou a epidemia na China em 2003 e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), responsável pela mesma condição em 2012. A dinâmica do SARS-CoV-2 não é totalmente conhecida, mas há especulação de que também seja de origem e transmissão zoonótica (LORENZ et al., 2021).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) atuou imediatamente sobre a doença emergente. Em 22 de janeiro de 2020, foi acionado o Centro de Operações de Emergência (COE) do Ministério da Saúde para planejamento e organização das atividades com os responsáveis para o monitoramento da situação epidemiológica. Houve mobilização de vários setores do governo e diversas ações foram implantadas, inclusive um plano de contingência. Em 3 de fevereiro de 2020, a COVID-19 foi declarada Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (FIGUEIREDO et al., 2020).

O MS informou para a população estratégias fundamentais para o enfrentamento da epidemia. Os números de casos confirmados e óbitos passaram a ser disponibilizados diariamente. Boletins epidemiológicos passaram a ser publicados diariamente a fim de orientar sobre a questão da atuação da vigilância no contexto epidemiológico. A partir de abril de 2020, o MS passou a orientar a população para o uso de máscaras de pano, para atuarem como barreira à propagação do SARS-CoV-2 (OLIVEIRA et al., 2020).

O primeiro caso de COVID-19 no Brasil foi confirmado em 26 de fevereiro de 2020. Esse diagnóstico veio de um paciente do sexo masculino, idoso e residente do estado de São Paulo, que havia retornado de uma viagem à Itália. A doença se propagou rapidamente e em menos de um mês após a

confirmação do primeiro caso já havia transmissão entre algumas cidades.

Em 17 de março de 2020, ocorreu o primeiro óbito por COVID-19 no Brasil. Outro homem idoso, também residente em São Paulo, que apresentava diabetes e hipertensão como comorbidades, mas sem histórico de viagem ao exterior. Em 20 de março de 2020, foi reconhecida a transmissão comunitária da COVID-19 em todo o território nacional (FIGUEIREDO et al., 2020).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIA DA COVID 19

A COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, tornou-se uma pandemia. A identificação e notificação do número de pessoas infectadas pelo vírus com altas taxas de transmissão e morbimortalidade, é um fator crucial para o monitoramento e controle da pandemia. Sendo assim, as ações de vigilância epidemiológica fornecem informações pertinentes aos gestores para que sejam tomadas as melhores decisões sobre os próximos passos para controle da situação, mas no início da pandemia ainda havia muitas lacunas em relação ao conhecimento da dinâmica de transmissão desse vírus (CORRÊA et al. 2020). Sem dúvidas, a pandemia de COVID-19 é a mais grave crise socioeconômica e de saúde pública do nosso tempo (RIGGIONI et al., 2020).

Durante a pandemia, surgiram diversas campanhas de conscientização quanto aos cuidados para se evitar a propagação da doença. Destacou-se a importância da lavagem das mãos, uso de álcool em gel, de máscaras de pano e quando possível o isolamento social para desacelerar a transmissão do SARS CoV-2 (XU C, et al., 2020).

Os casos de COVID 19, mesmo com todos os esforços para controle e extinção da virose, atingiram níveis epidemiológicos alarmantes (ESCOBEDO et al., 2022). Em meados do ano de 2021 o surgimento de variantes do vírus SARS-CoV-2 tornou-se um dos principais desafios enfrentados por essa pandemia (MARTIN et al., 2021). Desde então, foram descritas múltiplas variantes do SARS-CoV-2, das quais algumas são consideradas variantes preocupantes (VOCs), devido ao seu impacto na saúde pública, pois está associada a maior virulência, redução na neutralização por anticorpos obtidos por meio da vacinação e a capacidade de diminuir a eficácia da vacinação.

Com base na atualização epidemiológica da OMS, em 11 de dezembro de 2021, cinco COVs SARS-CoV-2 foram identificados desde o início da pandemia: Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1), Delta (B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529).

A fim de prevenir efetivamente a infecção pelo novo coronavírus e controlar a propagação do vírus, cientistas de todo o mundo realizaram pesquisas a cerca de estratégias de tratamento, incluindo vacina, imunoterapia e agentes antivirais (CASCELLA et al., 2022). A vacina é a melhor estratégia para prevenir a doença COVID-19. Atualmente, as vacinas utilizadas são as inativadas, a de vetor viral, de DNA e vacinas de mRNA (OMS, 2021).

De acordo com o boletim do Ministério da Saúde, até o final da semana epidemiológica (SE) 41 de 2022, no dia 15 de outubro de 2022, foram confirmados 624.407.708 casos de COVID-19 no mundo. O Brasil é o quarto país com maior número de casos acumulados com 34.748.678 de casos confirmados. Em relação aos óbitos, foram confirmados 6.566.866 no mundo até o dia 15 de outubro de 2022 e no Brasil 687.153. Com base nos dados diários informados pelas Secretarias Estaduais de Saúde (SES) ao MS, de 9 de outubro de 2020 a 15 de outubro de 2022, foram confirmados 34.748.678 casos e 687.153 óbitos por COVID-19 no Brasil. Para o País, a taxa de incidência acumulada foi de 16.409,80 casos por 100 mil habitantes, enquanto a taxa de mortalidade acumulada foi de 324,5 óbitos por 100 mil habitantes. A SE 41 de 2022 encerrou com um total de 29.653 novos casos registrados, o que representa uma redução de 27% (diferença de 10.862 casos), quando comparado ao número de casos registrados na SE 40 (40.515). Em relação aos óbitos, a SE 41 encerrou com um total de 311 novos registros, representando um aumento de 47% (diferença de 311 óbitos) se comparado ao número de óbitos novos na SE 39 (472 óbitos). Ao observar a Região Sudeste, Rio de Janeiro apresentou a maior incidência (23,2 casos/100 mil hab.) e São Paulo a maior mortalidade (0,3 óbitos/100 mil hab.).

### 1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA COVID-19

É conhecido pela literatura que a COVID-19 pode apresentar-se

cl clinicamente de diferentes formas: o paciente pode estar assintomático, apresentar doença respiratória aguda ou pneumonia com diferentes evoluções de gravidade (LAI et al., 2020).

Lu e colaboradores (2020) realizaram uma metanálise que envolvia a apresentação clínica de pacientes de diferentes estudos. Os principais sintomas apresentados foram: febre falta de ar , tosse, mialgia ou fadiga, expectoração, cefaleia,tontura, diarreia e vômitos ou náuseas. O quadro clínico da COVID-19 na forma mais grave é caracterizado por uma tempestade inflamatória de citocinas, com alterações hematológicas e da coagulação que tendem a danificar o tecido e conseqüentemente a morte (XAVIER et al., 2020).

Os sintomas clínicos da COVID-19 incluem febre, tosse, perda do olfato e/ou paladar e falta de ar, esse último era considerado o sintoma principal no início da pandemia (RUAN et al., 2020). Entretanto, os sintomas febre, tosse, dor de garganta, coriza, cefaleia, fadiga, mialgia e dispneia são os sinais e sintomas clínicos que tem sido frequentemente relatado por pacientes com COVID-19 (ROSSO et al., 2022).

#### 1.4. DIAGNÓSTICO DA COVID-19

O diagnóstico é um fator crucial para o controle da pandemia de COVID-19. Foram desenvolvidos testes de diagnóstico para a COVID-19 usando novas tecnologias. Três tipos de testes diagnósticos são relevantes para o diagnóstico e monitoramento da pandemia: testes de amplificação molecular (RT-qPCR), testes sorológicos para pesquisa de antígenos e de anticorpos (PEELING et al., 2022).

O teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa (RT-qPCR) é um teste molecular altamente sensível e específico para a detecção de RNA viral, e recomendado pela OMS para confirmar diagnóstico em indivíduos sintomáticos e para ativar medidas de saúde pública (SULE et al., 2020).

Os testes sorológicos, embora sejam menos sensíveis do que os testes

moleculares têm as vantagens de serem menos caros e mais rápidos de se obter um resultado. No caso dos testes de detecção rápida de antígenos, permite que haja um controle maior da propagação da infecção viral a outras pessoas podendo ser usados como uma ferramenta de saúde pública para contenção da doença. Já os testes de detecção de anticorpos (que detectam a resposta do hospedeiro à infecção ou vacinação), com a campanha de vacinação podem ser utilizados como ferramentas de vigilância úteis para informar e atualizar as políticas públicas a cerca da situação da pandemia de COVID-19. Entretanto, não devem ser usados como diagnóstico da virose. Todos os três tipos de teste COVID-19 continuam a ter um papel crucial na transição da resposta à pandemia para o controle da pandemia (PEELING et al., 2022).

Tanto o teste molecular, quanto o de detecção de antígenos podem ser usados para diagnosticar a infecção aguda. No entanto, os testes sorológicos fornecem apenas evidências indiretas da infecção cerca de 7 a 15 dias após o início dos sintomas e devido a isso são mais utilizados para vigilância pública (PEELING et al., 2022).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomendava que a técnica de RT-qPCR fosse realizada entre o terceiro e o nono dia após o início dos sintomas, pois, nessa fase, era possível encontrar maior carga viral. Entretanto, a coleta de amostras poderia ser aceitável se realizada até o décimo dia. Estudos demonstravam que após o sétimo dia, a positividade da RT-qPCR começava a cair, chegando a 45% entre os dias 15 e 39 após o início dos sintomas (XAVIER et al., 2020).

Atualmente a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que o diagnóstico laboratorial seja realizado utilizando testes moleculares, que visam à detecção do RNA do SARS-CoV-2 em amostras do trato respiratório por RT-q-PCR. Até o momento, este permanece sendo o teste laboratorial padrão-ouro para o diagnóstico da COVID-19 em pacientes sintomáticos na fase aguda (entre o 3º e 7º dia de doença, preferencialmente).

Os testes de antígeno indicam a presença de uma infecção viral aguda. São relativamente simples, em comparação com o teste molecular, e a maioria não exige uma estrutura laboratorial complexa, podendo ser realizado no local

de atendimento do paciente. Os testes rápidos de antígeno podem ser utilizados para o diagnóstico na fase aguda da doença (geralmente recomendado do 1º ao 7º dia após início dos sintomas) e são realizados a partir de diferentes amostras clínicas (esfregaço nasofaríngeo ou nasal, saliva, escarro) com resultados sendo liberados em aproximadamente 15 minutos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Em contrapartida, os testes de antígeno são geralmente menos sensíveis do que o RT-q-PCR.

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), o desempenho clínico dos testes de antígeno é influenciado pelas circunstâncias em que são aplicados. O teste apresenta um melhor desempenho quando o indivíduo testado apresenta uma carga viral alta, ou seja, quando existe a manifestação de sinais clínicos e sintomas indicativos da COVID-19. Em geral, os testes de antígeno têm uma alta especificidade, embora não sejam tão sensíveis quanto os testes moleculares que amplificam o material genético viral para gerar um sinal quantificável, indicador da presença do vírus em uma amostra.

Portanto, para compensar a diminuição potencial na sensibilidade de um teste de antígeno, os resultados negativos devem ser analisados em conjunto com fatores adicionais do paciente, como histórico de exposição à COVID-19, sintomas clínicos, resultados de testes adicionais para ajudar a orientar o diagnóstico do paciente.

De acordo com o MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS), os testes sorológicos para detecção de anticorpos permitem conhecer o perfil sorológico da população, identificando a resposta imunológica (produção de anticorpos IgA, IgM e/ou IgG) do indivíduo em relação ao vírus SARS-CoV-2. Entretanto, possui uso limitado para diagnóstico da COVID-19 uma vez que, devido às características da infecção, fornece diagnóstico tardio, geralmente oito dias após o início dos sintomas.

## 1.5. INFECÇÕES FÚNGICAS E COVID 19

Os fungos são organismos amplamente distribuídos no ambiente

dispersando-se sob a forma de propágulos fúngicos por diversas vias entre as quais o ar, a água e vetores como insetos, pássaros e mamíferos. Seu diversificado aparato enzimático os capacita a colonizar diversos tipos de substratos de origem animal, vegetal e até compostos sintéticos como plástico (ALEXOPOULOS et al., 1970).

Existem cerca de 1 a 5 milhões de espécies de fungos no planeta Terra, mas apenas algumas centenas são conhecidas como patógenos humanos (O'BRIEN et al. 2005).

Os fungos são classificados como integrantes do seu próprio reino: o Reino Fungi, que é dividido em sete filos: Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, blastocladiomycota, Microsporídia, Glomeromycota, Ascomycota, Basidiomycota e o grupo dos fungos anamórficos.

A classificação taxonômica de *P. brasiliensis* é: reino Fungi, filo Ascomycota, subdivisão Euascomycotina, classe Plectomyceto, subclasse Euascomycetidae, ordem Onygenales, família Onygenaceae, subfamília Anamórficos, gênero *Paracoccidioides* (SAN-BLAS et al. 2002). *Histoplasma capsulatum* integra o filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Onygenaceae, gênero *Histoplasma*, espécie *Histoplasma capsulatum* (HIBBETT et al., 2007).

O gênero *Candida* faz parte do filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales (DIEZMANN et al., 2004) e o gênero *Aspergillus* é um anamórfico pertencente à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes, filo Ascomycota (KLICH, 2002).

Segundo Mayer e colaboradores (2013), dentre as espécies de fungos descritas, cerca de 600 são capazes de causar infecções em humanos. Essas infecções podem ser classificadas como infecções superficiais, cutâneas, subcutâneas, as sistêmicas e as infecções oportunistas com potencial risco de morte.

Os fungos causadores de micoses humanas são divididos em dois grupos: patógenos primários e patógenos oportunistas (MURRAY et al., 2009). Entre os patógenos primários destacamos os causadores das micoses sistêmicas que se caracterizam por serem adquiridas por inalação de propágulos fúngicos, causando lesão pulmonar primária com tendência à regressão espontânea em hospedeiros imunocompetentes. A partir da localização pulmonar, o agente pode se disseminar pelo sangue, originando

lesão em vários outros órgãos (WANKE et al., 1996).

As micoses endêmicas sistêmicas são causadas principalmente por fungos termodimórficos que se distribuem em regiões limitadas, ocupando nichos ecológicos específicos no ambiente (LOCKHART et al., 2021). As micoses endêmicas mais comuns são blastomicose, coccidioidomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, criptococose gatti, esporotricose e, mais recentemente, talaromicose, adiaspiromicose e emergomicose, micoses essas que são consideradas emergentes, pois o número de casos tem aumentando em todo o mundo nos últimos anos (ALMEIDA-PAES et al., 2022).

As micoses histoplasmose, paracoccidioidomicose e coccidioidomicose são micoses sistêmicas de grande importância epidemiológica e endêmicas no Brasil. Seus agentes etiológicos podem causar doença tanto em pacientes imunocompetentes, como se manifestarem como agentes oportunistas em pacientes imunocomprometidos (COURA; PEREIRA, 2019).

As micoses oportunistas são causadas por fungos que normalmente convivem pacificamente com o hospedeiro, mas ao encontrarem condições favoráveis, como distúrbios do sistema imunológico, passam a ser patogênicos, invadindo os tecidos. As micoses oportunistas afetam pacientes com algum comprometimento do sistema imunológico, e podem acometer o trato respiratório, causando pneumonias por vezes letais (PATTI et al., 2020). Embora novas espécies fúngicas sejam identificadas em Infecções em pacientes imunocomprometidos, as infecções oportunistas mais prevalentes são a candidíase, aspergilose, criptococose causada por *Cryptococcus neoformans* e a mucormicose (NAKAMURA et al., 2013).

Um aumento expressivo nas taxas de incidência e mortalidade por infecções fúngicas tem sido relatado entre os pacientes com COVID-19, especialmente aqueles que receberam terapias imunossupressoras ou que têm doenças subjacentes (CAFARDI et al., 2021). Entre as infecções oportunistas, as infecções fúngicas são responsáveis pela maioria dos relatos de casos em pacientes com COVID-19 (ABDOLI., 2021).

Pacientes com COVID-19 grave, como indivíduos em unidades de terapia intensiva (UTI), são mais propensos a apresentar infecções secundárias bacterianas e fúngicas. As infecções fúngicas invasivas mais prevalentes neste

contexto são aspergilose e candidíase. No entanto, outras espécies fúngicas têm sido cada vez mais associadas a doenças fúngicas oportunistas em pacientes com COVID-19, entre elas *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Cryptococcus* spp. Tem sido relatado aumento dessas coinfeções graves, devido à resposta imune do hospedeiro e muitas vezes associadas à morte (ROUDBARY et al., 2021).

A COVID-19 propiciou um grande aumento dos casos de pacientes com SARS, e as coinfeções se tornaram frequentes (ROUDBARY et al., 2021). Em suma, várias infecções oportunistas foram identificadas em pacientes com SARS (TALENTO et al., 2020).

De acordo com Roudbary e colaboradores (2021) houve um aumento no número de casos de pacientes com COVID-19 e coinfeções fúngicas, reportados em 2020 e 2021. Entre elas, a aspergilose com 5% de aumento, histoplasmose com 125%, murcomicose 82%, coccidioidomicose 50% e pneumocistose com 3% de aumento dos casos.

Dados sobre infecções fúngicas na pneumonia causada por coronavírus não são amplamente conhecidos. No entanto, em um estudo de coorte, 22% dos pacientes com SARS apresentaram infecções secundárias do trato respiratório inferior, sendo *Candida* spp. frequentemente identificada (ZHENG et al., 2003), seguida por *Aspergillus* spp. (RIJNDERS; SCHAUWVLIEGHE; WAUTERS, 2020).

Ainda é desconhecido como as infecções fúngicas em longo prazo impactam o desfecho dos pacientes hospitalizados com COVID-19. Mas de acordo com Silva e colaboradores (2021), pacientes acometidos com essas coinfeções, apresentam 3,8 vezes mais chance de vir a óbito quando comparados com pacientes que não apresentaram diagnóstico comprovado para doença fúngica. Além disso, um estudo de revisão sobre coinfeção de micoses endêmicas (ME) com COVID-19, utilizando as bases de dados PubMed, Latindex, Google Scholar, Scopus e SciELO, relatou que até 31 de dezembro de 2021, foram publicados setenta e oito casos de COVID-19 associados a ME. A distribuição geográfica desses casos é mostrada na figura 2 (MESSINA et al., 2022).

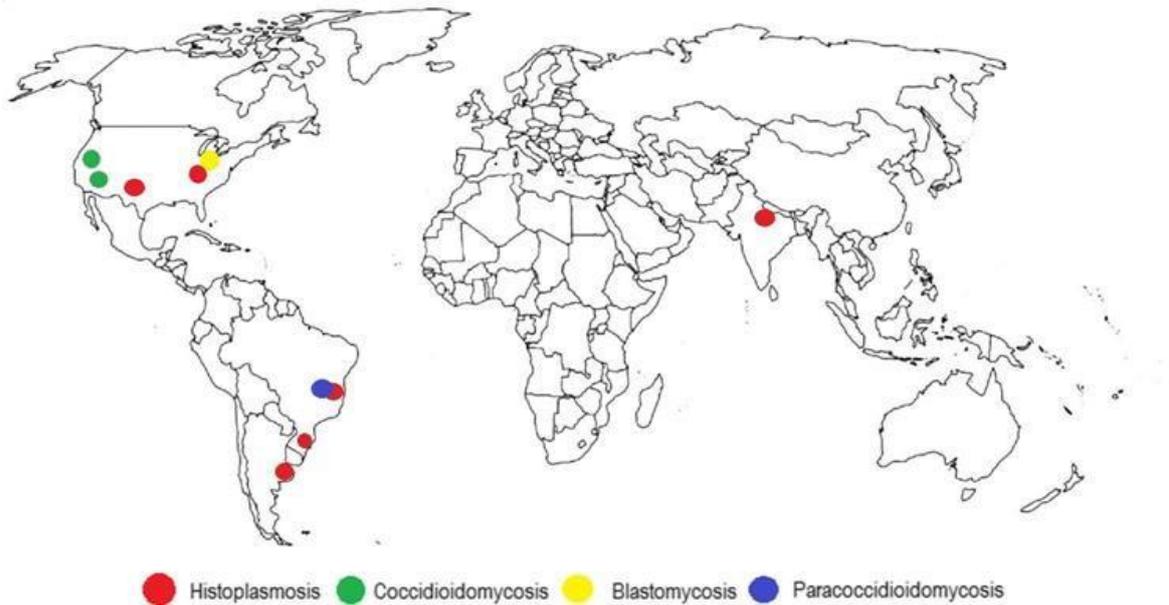


Figura 1: Áreas geográficas em que os casos de micoses endêmicas e COVID 19 foram informados. Fonte: MESSINA et al., 2022

As infecções fúngicas são frequentes nos pacientes com COVID-19, então o conhecimento adequado do diagnóstico associado a um tratamento eficaz das coinfeções fúngicas pode levar a uma redução da mortalidade (ROUDBARY et al., 2021).

### 1.5.1. Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides*. Em cultivos a 35-36°C, *Paracoccidioides* spp cresce rapidamente e forma colônias de coloração creme e de aspecto cerebriforme (Figura 3A), apresentando na micromorfologia (Figura 3C e 3D) elementos fúngicos arredondados, de paredes espessas, birrefringente e com múltiplos brotamentos ao seu redor (LACAZ et al., 2002). Quando cultivado em laboratório apresenta crescimento lento a temperaturas entre 25°C-28°C, e após 3 a 4 semanas de incubação surgem as colônias cotonosas e esbranquiçadas (Figura 3B), com micromorfologia composta por hifas finas hialinas, septadas, ramificadas e

clamidioconídios (LACAZ et al., 2002).

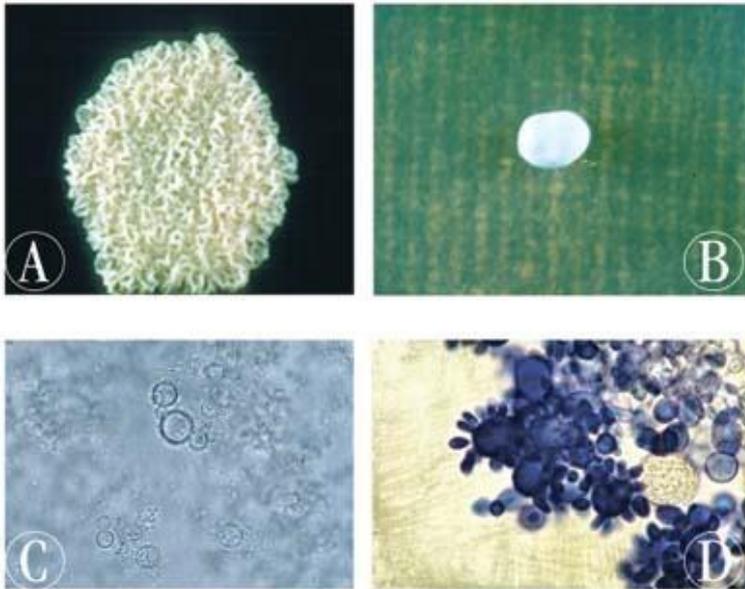


Figura 2. Cultivo de *Paracoccidioides* spp. . A- Fase leveduriformel, B- Fase filamentosa, C- Exame a fresco a KOH, D- Exame corado com lactofenol mostrando células leveduriformes com múltiplos brotamentos.

Fonte: SHIKANAI-YASUDA et al., 2006.

Paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica endêmica, que ocorre nas áreas úmidas subtropicais da maioria dos países da América Latina (Figura 4)(THOMPSON et al., 2021), e cerca de 80% dos casos estão concentrados no Brasil (CHAVES et al., 2021). Sua distribuição regional é desigual, mas o estado do Rio de Janeiro se apresenta com uma área endêmica de extrema importância (DE MACEDO et al., 2017).

No Brasil, as micoses sistêmicas não fazem parte da lista nacional de doenças de notificação compulsória. Apenas em alguns estados brasileiros a paracoccidioidomicose (PCM) integra o rol das doenças de notificação compulsória, devido a isso não há disponível dados precisos sobre sua ocorrência em nível nacional. Na ausência do registro regular de dados clínicos e epidemiológicos sobre essas micoses, o conhecimento sobre áreas endêmicas, sua prevalência, incidência e morbidade baseia-se em estudos de séries de casos, estudos de isolados do microrganismo e suas linhagens (MILLINGTON et al., 2018).

No estado do Rio de Janeiro devido á publicação da resolução n° 88/CIB/SES, a partir de 28 de outubro de 2020, a paracoccidioidomicose passou

a ser doença de notificação compulsória na esfera estadual.

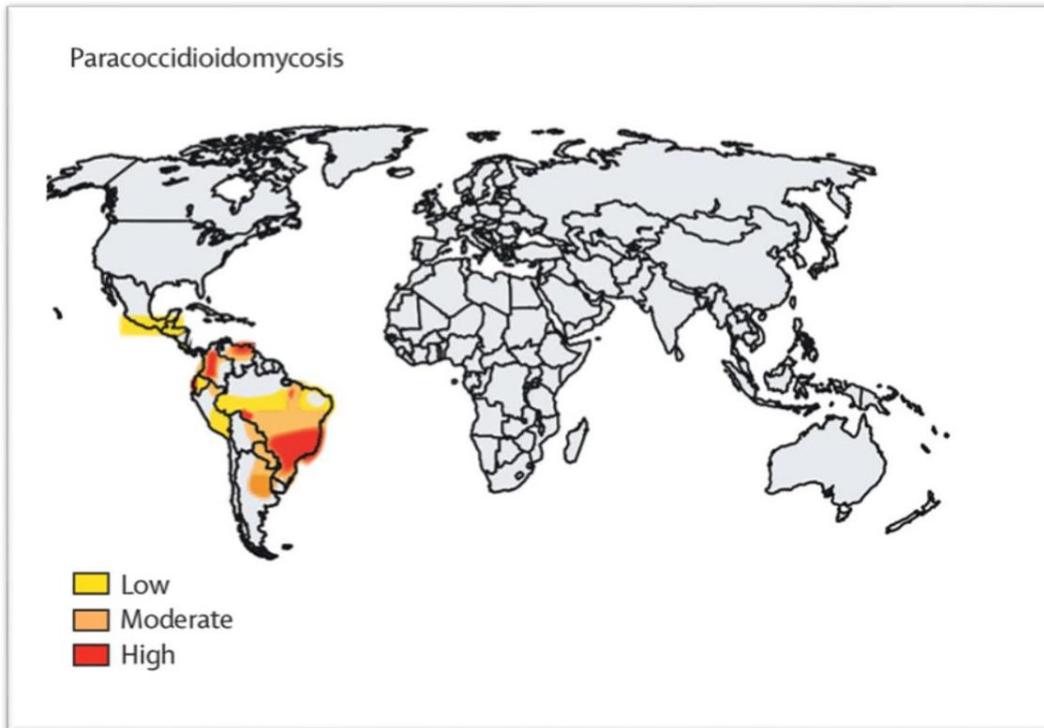


Figura 3: Mapa da distribuição geográfica da micose sistêmica endêmica paracoccidioidomicose. Fonte: Adaptado de THOMPSON et al., 2021.

Considerada a terceira causa de morte por doença infecciosa crônica no Brasil, a PCM é um problema de Saúde Pública em nosso país pelo seu elevado poder infectante e a altas taxas de mortalidade precoce. A infecção costuma ser adquirida nas duas primeiras décadas de vida do indivíduo. Entretanto, apresentação das manifestações clínicas ocorre mais frequentemente em homens com faixa etária entre 30 e 50 anos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A infecção se dá através da inalação de conídios de *Paracoccidioides* spp presentes no solo de áreas endêmicas. Uma vez inalados, os conídios avançam para os alvéolos pulmonares, onde se instalam, convertem-se para a fase leveduriforme e constituem o início da doença (MARTINEZ, 2017), que se manifesta em duas formas clínicas. A mais prevalente é a forma crônica (tipo adulto), responsável por 80% dos casos de PCM, que ocorre principalmente em

trabalhadores rurais. A outra forma é a aguda (tipo juvenil), que ocorre mais em pacientes jovens com envolvimento progressivo do sistema fagocitário mononuclear, resultando em muitas complicações, incluindo a morte (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017, DE MACEDO et al 2017, 2020).

Na forma aguda da PCM alterações pulmonares são raras, mas ainda assim, achados radiológicos como consolidações e derrame pleural podem ocorrer em alguns casos. E a ocorrência de alguns achados radiológicos sobrepostos entre PCM e COVID-19 pode atrasar o diagnóstico de coinfeção. O tabagismo frequente, doença pulmonar obstrutiva crônica e alterações pulmonares causadas pela PCM podem levar à fibrose tecidual, o que pode representar um fator de risco para casos graves de COVID-19 (DE MACEDO et al., 2020).

Um estudo brasileiro realizado no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ), no estado do Rio de Janeiro, reportou um caso de coinfeção PCM e COVID-19. Um homem de 19 anos com distensão abdominal, lesões cutâneas disseminadas e múltiplos linfonodos cervicais, axilares e inguinais foi avaliado. A análise histopatológica dos linfonodos revelou a presença de múltiplas estruturas fúngicas em brotamento típicas de *Paracoccidioides* spp. em lâminas coradas pelo método de coloração de metenamina de prata de Grocott-Gomori (GMS). Foram detectados anticorpos séricos contra *Paracoccidioides* spp. no teste de ID, e o diagnóstico foi confirmado pela cultura de aspirado ganglionar com isolamento e identificação de *Paracoccidioides* spp. Após o 26º dia de internação a saturação de oxigênio [SpO<sub>2</sub>] do paciente caiu para 70%. Foi iniciada a intubação para ventilação mecânica. Foi realizado exame de RT-PCR, que resultou positivo para COVID-19 (DE MACEDO et al., 2020).

### 1.5.2. Histoplasmose

A histoplasmose é uma micose sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Histoplasma capsulatum*, encontrado na natureza sob a forma filamentosa e no hospedeiro sob forma de levedura.

Em temperaturas inferiores a 35°C, *H. capsulatum* se apresenta como

colônias brancas a acastanhadas, algodonosas, e microscopicamente caracterizado por hifas hialinas, septadas, ramificadas (Figura 5A) e de morfologia típica, representada por macroconídios tuberculados, como pode ser visto na Figura 5B. Os microconídiospiriformes e pequenos fragmentos de hifas são as partículas infectantes deste fungo para os homens e animais suscetíveis (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2013). Quando cultivado em laboratório em meios apropriados a temperaturas entre 35-37°C, *H. capsulatum* converte à forma leveduriforme (Figura 5C) (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 2013).

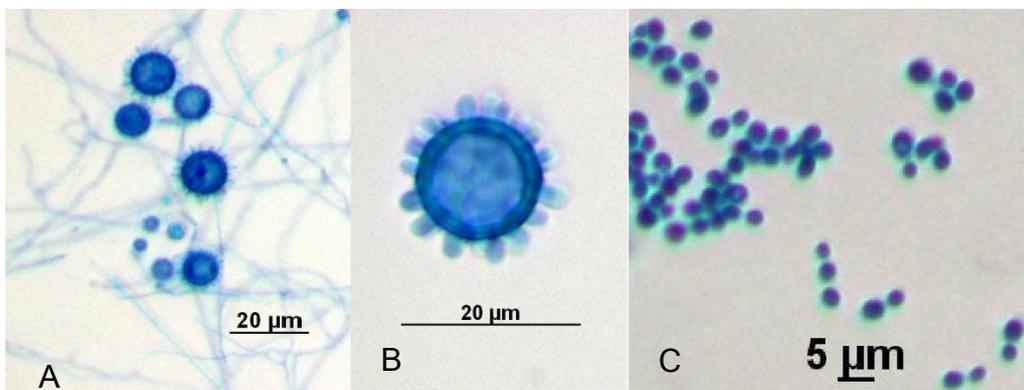


Figura 4: Micromorfologia de *Histoplasma capsulatum*. Fase filamentosa: Aspectos microscópicos com micro e macroconídios característicos e hifas hialinas septadas (A). Macroconídios tuberculados (B). Fase leveduriforme: Aspectos microscópicos da com leveduras unibrotantes (C).

Fonte: Almeida et al., 2019

A histoplasmose é uma doença cosmopolita, com áreas de alta endemicidade em regiões dos Estados Unidos da América e na América Latina (COUPPIÉ et al., 2006; COLOMBO et al., 2011). No Brasil, a histoplasmose é uma micose endêmica, com maior incidência nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (ALMEIDA et al., 2019).

Em um estudo de revisão da literatura buscando os casos de histoplasmose reportados no Brasil entre os anos de 1939 e 2018, foram encontrados 207 artigos, os quais apresentam casos desta micose em quase todo o território nacional. Apenas sete estados brasileiros não possuíam relatos de caso de histoplasmose humana publicados em artigos

científicos, entre eles Acre, Alagoas, Amapá, Rio Grande do Norte, Rondônia, Roraima e Tocantins (ALMEIDA et al., 2019).

Logo em seguida, em 2019, um estudo de coorte prospectivo multicêntrico envolvendo pessoas que vivem com HIV foi realizado em 14 hospitais brasileiros. As instituições estavam localizadas em Porto Alegre, Rio Grande, Santa Maria, Curitiba, São Paulo, Goiânia, Salvador, Natal, Fortaleza, Manaus e Macapá. O estudo foi realizado entre 2016 e 2018 (FALCI et al., 2019).

O Brasil é um país continental que possui muitas disparidades com relação clima, composição do solo e economia. Nesse estudo foi possível observar uma grande prevalência (>40%) de histoplasmose provável/comprovada entre pessoas que vivem com HIV no nordeste do Brasil, especialmente nas cidades de Fortaleza e Natal (FALCI et al., 2019), onde até 2018 não havia relato de caso publicado de histoplasmose.

A infecção é adquirida pela inalação de propágulos fúngicos infecciosos geralmente presentes em solos contendo excrementos de aves e morcegos (COLOMBO et al., 2011). Portanto, a exposição ao fungo pode ser ocupacional, ocorrendo durante a construção, renovação, demolição, atividades de escavação, bem como recreativas (ALMEIDA et al., 2019).

O espectro clínico dessa doença varia de uma doença assintomática a uma doença disseminada progressiva. O foco principal desta infecção fúngica é o pulmão, e o prognóstico da doença depende da resposta imune do hospedeiro, a carga parasitária inalada, e a virulência do isolado fúngico (DEEPE E BUESING, 2012). Pacientes imunocomprometidos submetidos a corticosteroides ou outras formas de terapia imunossupressora podem desenvolver a forma mais grave da doença devido à disseminação de fungos para diversos órgãos (DAMASCENO et al., 2013 ;KAUFFMAN, 2007).

Roudbary e colaboradores (2021), em um estudo de revisão, demonstraram que os pacientes do seu estudo que receberam corticóide para tratar COVID-19, desenvolveram a histoplasmose enquanto os que não receberam não desenvolveram a histoplasmose. Mas ainda há poucos estudos sobre a coinfeção de *H. capsulatum* e COVID-19 ao redor do mundo.

Estudo realizado no INI-Fiocruz reportou dois casos de histoplasmose pulmonar em pacientes recuperados da COVID-19. A hipótese para explicar

essa associação seria que o dano pulmonar provocado por SARS-CoV-2 facilitou o desenvolvimento de histoplasmose aguda após inalação de conídios infectantes do meio ambiente. Isso é o que provavelmente aconteceu com os pacientes envolvidos no estudo, que tiveram exposição a *H. capsulatum* presente no ambiente após a recuperação da COVID-19. A segunda hipótese é que a terapia com corticosteróides usada no tratamento de casos graves de COVID-19 pode reativar focos latentes de *H. capsulatum* dentro dos pulmões. Provavelmente, foi o que aconteceu com o paciente do caso 2, que já havia sido infectado anteriormente por esse agente fúngico, devido ao fato de morar local com morcegos, principal animal envolvido na transmissão e disseminação da histoplasmose (DE MACEDO et al., 2020).

### 1.5.3. Candidíase

A candidíase é uma infecção de grande relevância mundial, sendo frequentemente detectada em infecções hospitalares (ARASTEHFAR et al., 2020). Esta é considerada a segunda infecção fúngica oportunista mais frequente em todo o mundo (BROWN et al., 2012).

Cerca de duzentas espécies compõem o gênero *Candida*, entretanto, 95% dos isolados obtidos em hemoculturas foram pelas espécies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, as amostras identificadas em meio CHROMagar Candida® apresentam-se com as seguintes características: colônias verdes para *C. albicans*, lilás ou branca para *C. glabrata*, azul para *C. tropicalis* e roxo para *C. krusei* (figura 7) (PFALLER et al., 2010).



Figura 5: Características do crescimento das colônias do gênero *Candida* em meio cromogênico. Fonte: BOSCARIOL et al., 2012

As leveduras pertencentes ao gênero *Candida* (figura 8), são as espécies fúngicas mais prevalentes que habitam várias superfícies mucosas, como a pele e os trato respiratório, digestivo e genito-urinário (ROLLING et al., 2020). Apesar de serem comensais do hospedeiro humano, as espécies de *Candida* são dotadas de fatores de virulência, que permitem que invadam os tecidos, quando há quedas no sistema imune e cause infecções em humanos (ROLLING et al., 2020). A transição de levedura para hifa é o fator de virulência mais conhecido (WANG., 2015).

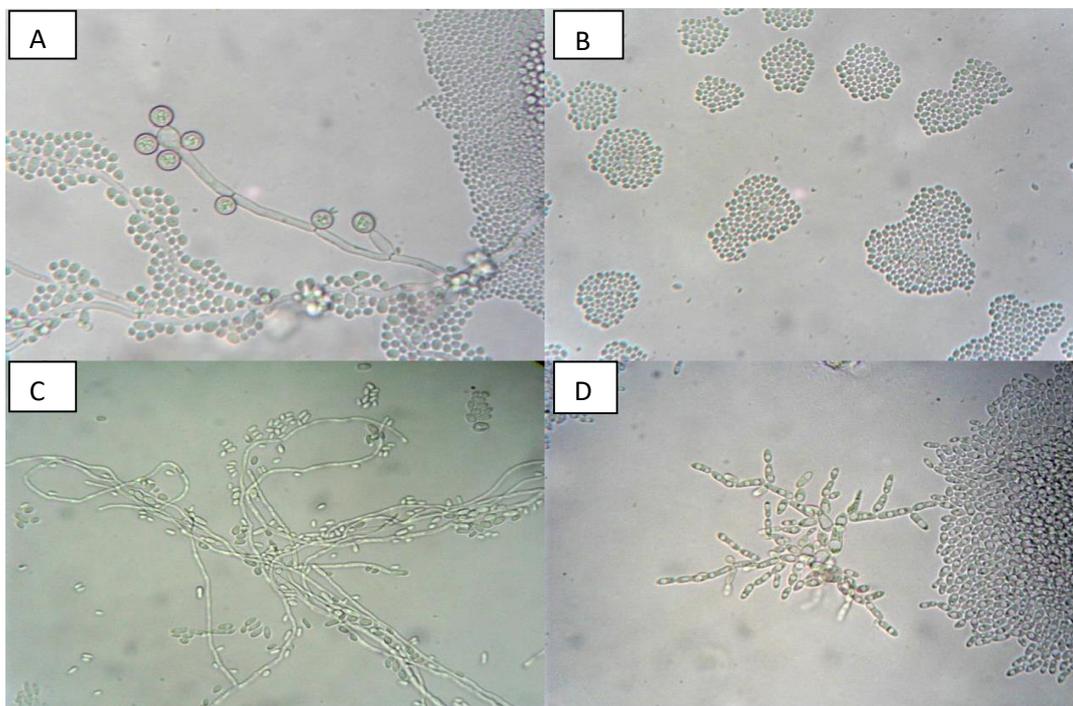


Figura 6: Características micromorfológicas de leveduras do gênero *Candida* em Agar Fubá (A: *Candida albicans*; B: *Candida glabrata*; C: *Candida tropicalis*; D: *Candida Krusei*)

Fonte: BOSCARIOL et al., 2012

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista comum, principalmente devido à ampla distribuição ambiental deste fungo e também porque aumenta cada vez mais o número de pacientes com fatores de risco para infecção por essa levedura. Os indivíduos com neoplasia hematológica, neutropenia, pacientes submetidos ao uso de corticosteroides são indivíduos com risco de infecção grave por *Candida*. Em pacientes internados em UTI, o uso de antimicrobianos de amplo espectro, cateteres intravenosos e ureterais, procedimentos cirúrgicos prévios, insuficiência renal e nutrição parenteral são os principais fatores de risco para infecções graves por *Candida* (KAUFFMAN et al., 2005).

O gênero *Candida* é relatado como a terceira causa das sepSES hospitalares em todo o mundo (PAPPAS et al., 2018). *Candida albicans* continua sendo ao longo dos anos a espécie mais comumente encontrada nas infecções causadas pelas espécies do gênero *Candida*, prevalecendo em 65,3 % das infecções, por este gênero, ao redor do mundo (RODRIGUES et al.,

2017; PFALLER et al., 2010).

Grande parte dos pacientes com COVID-19 necessita ser hospitalizado em uma UTI, além de receber nutrição parenteral e ventilação mecânica, o que em conjunto com a terapia com corticóides, os torna mais suscetíveis a infecções por *Candida* spp. Alguns estudos relatam que uma incidência de duas a dez vezes maior de candidemia foi relatada em pacientes com COVID-19 quando comparados com pacientes sem COVID-19 (RICHE et al, 2020; KAYAASLAN, 2021; HOENIGL, 2022). *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente relatada em pacientes críticos com COVID-19, sendo o agente etiológico em 33% dos casos de candidemia em um estudo multicêntrico nos EUA, seguido por *C. glabrata* 27% e *C. parapsilosis* com 19% dos casos (SEAGLE et al., 2022).

Na América do Sul, a incidência de candidemia varia de 0,74 a 6,0 por 1.000 internações hospitalares, e mesmo com os avanços no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico para infecções fúngicas, ainda se encontra dificuldades para aplicar o tratamento adequado devido aos custos altos e atrasos no diagnóstico, fazendo com que a taxa de mortalidade nesses casos varie de 30-78% (CORTÉS et al., 2020). Relatórios publicados nos últimos cinco anos indicam que *C. albicans* continua sendo a espécie mais prevalente na América do Sul. No nordeste do Brasil, a distribuição de espécies prevalentes seguiu a ordem de *C. albicans*: 35,3%, *C. tropicalis* : 27,4%, *C. parapsilosis* : 21,6% e *C. glabrata*: 11,8% (DE MEDEIROS et al., 2019). Canela e colaboradores (2018) relataram que no norte do Brasil *C. albicans* também foi a espécie predominante (44%), seguida por *C. glabrata* (19%), *C. tropicalis* (19%) e *C. parapsilosis* (14%) (RIERA et al., 2022).

A coinfeção candidíase e COVID-19 em pacientes gravemente enfermos têm sido relacionados a mais de 50% de taxa de mortalidade. A candidíase associada a COVID- 19 foi relatada em vários casos desde o início da pandemia. A permanência prolongada na UTI, o uso de cateteres venosos centrais e de corticosteroides estão entre os principais fatores de risco para candidíase em pacientes com COVID-19 (COLOMBO et al., 2006).

Em março de 2020, logo no início da pandemia, no Brasil, um paciente de 67 anos deu entrada no Hospital Alvorada Brasília na cidade de Brasília e testou positivo para COVID-19, por meio do teste de RT-PCR.

O paciente também foi diagnosticado com candidíase, porém somente por análise clínica, a partir de placas brancas observadas na mucosa oral. O paciente foi tratado pelos médicos com fluconazol endovenoso (Zoltec® 200 mg/100 mL, uma bolsa ao dia por dez dias) e teve alta do hospital após 44 dias e se recuperou da co-infecção (AMORIM DOS SANTOS et al., 2020).

No Brasil, no período de fevereiro a dezembro de 2020, 716 pacientes positivos para COVID-19, testados por RT-PCR, foram acompanhados em um hospital universitário. Nesta população foram constatados oito casos de coinfeção fúngica sendo quatro por *Candida* spp. Foram isoladas as espécies *C. albicans* entre outras espécies de *Candida* a partir de hemocultura dos quatro pacientes positivos para *Candida*. Todos os pacientes receberam tratamento com esteroides para COVID-19 e antifúngico para a Candidíase. No entanto os quatro pacientes que apresentaram a coinfeção candidíase e COVID-19 faleceram (MARTINS et al., 2021). Ainda no Brasil, em dezembro de 2020 houve o primeiro caso de infecção por *C. auris* identificado no Brasil, em um paciente hospitalizado devido a COVID-19 na cidade de Salvador (DE JONG et al., 2021).

O diagnóstico de candidíase invasiva continua desafiador, entretanto o diagnóstico e o tratamento precoces são importantes para o controle da doença (ARASTEHFAR et al., 2020).

#### 1.5.4. Aspergilose

A aspergilose é causada por fungos do gênero *Aspergillus* fungo onipresente que se distribui amplamente pelo meio ambiente. A maioria das pessoas está exposta a conídios destes fungos e os inala todos os dias sem adoecer. No entanto, indivíduos com sistema imunológico comprometido ou doenças pulmonares têm um risco maior de desenvolver aspergilose (SALMANTON-GARCÍA et al., 2021). Os conídios liberados no ar apresentam tamanho pequeno, com diâmetro de 2 a 3  $\mu\text{m}$ , o que facilita o alcance aos alvéolos pulmonares (RAPER et al., 1965).

Existem mais de 200 espécies dentro do gênero *Aspergillus*, entretanto

apenas cerca de 20 têm sido encontradas como causa de doença (RICHARDSON & WARNOCK, 2003). *Aspergillus fumigatus* é o agente etiológico responsável por aproximadamente 90% das aspergiloses invasivas diagnosticadas (ARAUJO et al., 2005a), seguidos por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* que são as espécies principais responsáveis por causar aspergilose (LIU S et al., 2022).

As colônias de *A. fumigatus* são de crescimento rápido, aproximadamente em 48 horas, inicialmente apresentam aspecto algodonosos que rapidamente assumem uma aparência pulverulenta fina esverdeada (figura 9 A). Microscopicamente observam-se cabeças colunares com hifas hialinas septadas, conídios hialinos com cadeias longas e finas (figura 9B). Os conidióforos são curtos, de paredes lisas e possuem vesículas terminais suportando uma única fileira de fiálides (uniseriado) nos dois terços superiores da vesícula (SALAZAR, RUA et al., 2013).

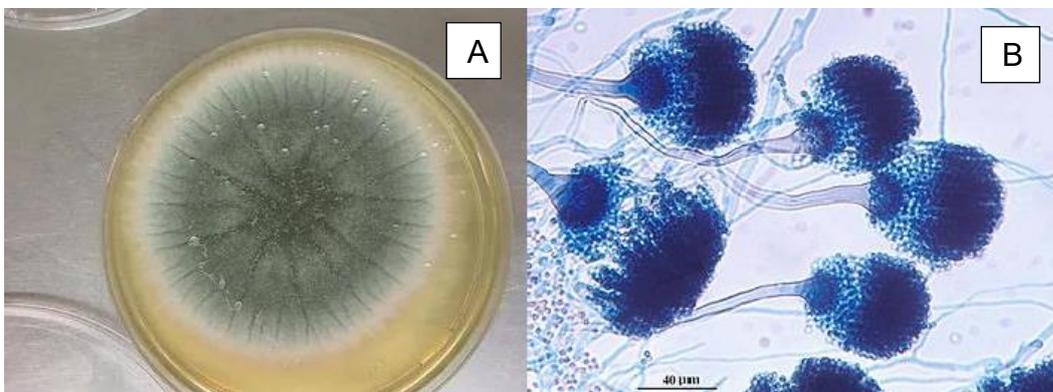


Figura 7: *Aspergillus fumigatus*. (A) Macromorfologia da colônia finamente granulosa de *A. fumigatus*, com textura aveludada, rugosa com tonalidade esverdeada. (B) Micromorfologia com cabeças colunares com conidióforos.

Fonte: [atlasmicologia.blogspot.com.br](http://atlasmicologia.blogspot.com.br)

*Aspergillus fumigatus* não possui um mecanismo elaborado para liberar seus conídios na atmosfera, a sua disseminação ocorre por meio das correntes de ar. Após serem liberados no ambiente, seu pequeno tamanho os torna flutuantes, favorecendo que permaneçam tanto em ambientes internos quanto externos. Pesquisas ambientais indicam que todos os humanos inalam pelo menos várias centenas de conídios de *A. fumigatus* por dia (GOODLEY et al., 1994).

A infecção pode ocorrer após a inalação dos conídios liberados na atmosfera por *Aspergillus* spp., mas a aspergilose refere-se a uma doença que depende de fatores do hospedeiro e de sua resposta imunológica para que se desenvolva. As formas não invasivas incluem aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e as invasivas incluem aspergilose pulmonar crônica e aspergilose pulmonar invasiva (AI) (CADENA et al., 2021).

A aspergilose broncopulmonar alérgica é causada por uma resposta TH2 exacerbada a *Aspergillus* spp., caracterizada pela ativação da resposta imune crônica (CADENA et al., 2021). A aspergilose pulmonar crônica é resultado da colonização saprofítica por *Aspergillus* em cavidade pulmonar. Embora a colonização fúngica seja mais frequente nas cavidades associadas a TB, pode ocorrer também em cavidades associadas à histoplasmose, nas bolhas de enfisema e nas bronquiectasias (CORREIA et al., 2014).

Para aperfeiçoar o diagnóstico, a Organização Europeia de Pesquisa e Tratamento do Câncer e o Instituto Nacional de Alergia e Grupo de Estudo em Micoses (EORTC/MSG) lançaram diretrizes que classificam a aspergilose pulmonar invasiva de acordo com critérios clínicos, radiológicos e microbiológicos. Para se considerar aspergilose pulmonar invasiva comprovada, deve-se realizar a biopsia pulmonar ou aspirado pulmonar e observar lesão tecidual e/ou o crescimento de *Aspergillus* spp. em cultura. Já a aspergilose pulmonar invasiva provável obedece a três critérios para ser considerada. Quanto aos fatores do hospedeiro: quando o hospedeiro apresenta episódio recente de neutropenia ( $< 500$  neutrófilos/mm<sup>3</sup>), receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas, uso prolongado de corticosteroide na dose mínima de 0,3 mg/Kg/dia por 3 semanas de prednisona ou outro agente equivalente nos últimos 110 dias, tratamento com outro imunossupressor de linfócitos T CD4+ e/ou presente imunodeficiência grave. Quanto aos aspectos tomográficos, observa-se um ou mais nódulos pulmonares bem circunscritos, com ou sem sinal do halo e quanto aos critérios microbiológicos que é por microscopia direta, citologia ou cultura de escarro, LBA ou escovado brônquico onde seja possível observar os elementos fúngicos ou crescimento de *Aspergillus* spp em cultura. Também se considera aspergilose pulmonar invasiva provável quando temos resultado positivo de galactomanana no soro,

plasma ou LBA (DE PAUW et al., 2008).

O diagnóstico confirmado requer um material de biópsia, considerado padrão ouro micológico) mostrando uma invasão do tecido pela hifa hialina com bifurcação de 45°, em estudo histopatológico e cultura positiva para *Aspergillus* spp. Muitas vezes, esse exame é de difícil realização pelos riscos do procedimento e pelas condições clínicas dos pacientes imunossuprimidos. A detecção da galactomanana é o exame que permite o diagnóstico durante fases muito precoces da infecção, antes do aparecimento das alterações tomográficas específicas, e sua dosagem seriada em sangue ou LBA pode ser utilizada para controle de tratamento e orientação de suspensão do antifúngico. Porém, esse exame é validado apenas em pacientes transplantados de medula óssea e portadores de câncer. Como método de imagem, a tomografia computadorizada de tórax auxilia no diagnóstico (DE PAUW et al., 2008).

Pacientes com COVID-19 internados em UTI correm alto risco de desenvolver infecções nosocomiais, inclusive infecções fúngicas, como aspergilose pulmonar invasiva (SÁNCHEZ MARTÍN C et al., 2022).

Os primeiros casos de aspergilose pulmonar associada à COVID-19 (CAPA) foram detectados na China no início de 2020 (YANG et al., 2020). A partir de então vários casos e estudos de coorte relataram a importância dessa micose potencialmente fatal causada por *Aspergillus* spp. (ARASTEHFAR et al., 2020). Os pacientes mais comumente acometidos são aqueles com insuficiência respiratória aguda por COVID-19, particularmente pacientes que recebem terapia com corticosteroides (KOEHLER et al., 2020).

A COVID-19 grave provoca dano alveolar difuso, infiltração neutrofílica intra-alveolar, congestão vascular e alteração da atividade mucociliar que pode levar o paciente a infecções secundárias. Na Aspergilose a broncoscopia e o cultivo em cultura do fungo e o teste de detecção da galactomanana, fornecem um diagnóstico. Os comprometimentos respiratórios de imagens mais comumente encontradas são padrão vidro fosco, consolidações nodulares, pneumopatia intersticial bilateral com evolução para a síndrome de angústia respiratória aguda, que podem ocasionar o óbito (GERVASIO et al., 2022).

Em um estudo de revisão sobre infecções pulmonares secundárias em pacientes com COVID-19, 18 de 28 estudos observacionais, identificaram fungos,

e a espécie predominantemente identificada foi *A. fumigatus*, seguido de *A. flavus*, *A. calidoustus*, *A. citrinoterreus*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. versicolor* (CHONG et al, 2020). Outro estudo relatou que 33% dos pacientes com COVID-19 possuíam aspergilose invasiva provável (IPA) (ALANIO et al., 2020). Apostolopoulou e colaboradores (2020) sugerem que a IPA está associada a altas taxas de mortalidade entre pacientes com COVID-19.

## 1.6. DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES FÚNGICAS

As abordagens tradicionais para o diagnóstico das infecções fúngicas incluem exame microscópico direto de amostras clínicas, cultura, detecção de antígenos e anticorpos específicos e métodos moleculares. São várias as opções de teste disponíveis para diagnóstico das infecções fúngicas, o grande problema é que testes específicos não estão disponíveis para todos os países inclusive em áreas consideradas endêmicas (MESSINA et al., 2022).

O diagnóstico definitivo baseia-se na identificação do agente em materiais biológicos, empregando-se simultaneamente duas metodologias: exame direto e cultivo. No exame direto, a demonstração da presença do agente fúngico em amostras clínicas por microscopia. A confirmação do diagnóstico se dá pelo isolamento e identificação do agente em amostras de tecido e/ou fluidos corporais através de cultivo em meios especiais para isolamento e esse crescimento ocorre de forma lenta, levando até semanas para que seja possível a observação do agente (ALMEIDA et al., 2019).

No intuito de driblar as limitações em relação aos métodos diagnósticos clássicos, as técnicas de biologia molecular têm contribuído para o desenvolvimento de abordagens que detectem indiretamente espécimes clínicos por meio da identificação de ácidos nucleicos específicos, oferecendo maior diagnóstico com maior rapidez, bem como alta sensibilidade e especificidade e facilidade na interpretação de resultados (ZANCOPÉ OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE 2013; ZANCOPÉ-OLIVEIRA et al. 2011).

O diagnóstico precoce é essencial, pois o atraso no início do tratamento está associado ao aumento da mortalidade (WILLINGER et al., 2021), e quando

se trata de doenças fúngicas ainda se torna um desafio, já que os métodos clássicos podem demorar dias para apresentar um resultado que favoreça ao clínico. Tais limitações trazem consequências para o paciente, pois o atraso do diagnóstico consequentemente atrasa o tratamento, podendo levar a óbito. O tempo para o diagnóstico laboratorial é o fator chave no tratamento dos pacientes (BARNES et al., 2008 ).

Uma das técnicas moleculares é a de Reação de polimerização em cadeia (PCR), ferramenta promissora para detecção de forma eficiente dos patógenos em amostras clínicas e permite um diagnóstico precoce, antes mesmo da cultura se tornar positiva (BUITRAGO et al. 2006).

Desde a década de 50 do século passado, os testes sorológicos para detecção de anticorpos têm sido ferramentas úteis para o diagnóstico das infecções fúngicas em paralelo a técnica de isolamento em cultura e identificação do fungo. Entre as tecnologias disponíveis estão a imunodifusão dupla (ID), a reação de fixação do complemento (CF) e os ensaios enzimáticos (EIA) (RICHARDSON et al., 2018).

Os métodos de diagnóstico a partir da detecção de anticorpos são importantes para o diagnóstico presuntivo das principais micoses sistêmicas e oportunistas, entre elas: aspergilose, histoplasmoze, paracoccidioidomicose, entre outras. Há casos em que o resultado desses métodos é a primeira indicação de infecção fúngica no paciente (FERREIRA et al., 2009).

Os ensaios sorológicos fornecem avaliação qualitativa e quantitativa dos anticorpos circulantes no sangue e podem ter um importante valor prognóstico (RICHARDSON et al., 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

Vários trabalhos têm sido publicados relatando casos de micoses em pacientes com COVID-19. As micoses sistêmicas endêmicas, tais como a histoplasmose e paracoccidioomicose, têm grande impacto em saúde pública e na economia de diferentes países da América Latina. No caso da paracoccidioomicose, 80% dos casos reportados ocorrem no Brasil. Desta forma, grande parte do conhecimento sobre a coinfeção *Paracoccidioides* spp. e SARS-CoV-2 será oriundo de estudos nacionais. O mesmo deverá ocorrer com a histoplasmose, que é endêmica na América Latina e que tem no Brasil o país com maior número de casos na região até meados do mês de maio do ano de 2020.

Os mesmos fatores de risco apresentados por pacientes hospitalizados por COVID-19 ocorrem nas micoses oportunistas, tais como uso de corticosteroides, intubação, ventilação mecânica, entre outros. Aproximadamente 5% dos pacientes hospitalizados por COVID-19 necessitam de internação em UTI. Estes pacientes apresentam alto risco de desenvolverem infecções secundárias, incluindo aspergilose pulmonar invasiva e candidíase.

Estudos sobre histoplasmose e paracoccidioomicose são bastante frequentes no Brasil. Estudos dessas micoses em pacientes com COVID-19 já foram reportados, mas ainda não é conhecido exatamente como as infecções fúngicas podem impactar no desfecho clínico do paciente acometido (RAWNSON et al., 2020). Na influenza, infecções fúngicas invasivas impactam na mortalidade dos pacientes (VERWEIJ et al., 2020). Os conhecimentos adquiridos sobre essas associações possibilitarão a determinação de parâmetros como a frequência de micoses de acometimento pulmonar na COVID-19.

Além disso, testes sorológicos rápidos, sensíveis e específicos para o diagnóstico possibilitarão condutas clínicas e preventivas mais apuradas nos pacientes com COVID-19, e conseqüentemente aumentando a qualidade de vida dos pacientes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar através de técnicas sorológicas a frequência de micoses de sistêmicas e oportunistas em pacientes adultos com COVID-19 hospitalizados no Centro Hospitalar INI-FIOCRUZ, no período de setembro de 2020 até dezembro de 2020, através de técnicas sorológicas bem como avaliar se essas micoses impactam na gravidade dos casos da COVID-19.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar testes de detecção de anticorpos anti-*Aspergillus* spp. *Candida* spp., *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* em pacientes com COVID-19;
- II. Comparar o resultado de diferentes métodos sorológicos atualmente existentes, realizados para detecção de anticorpos no diagnóstico de infecções fúngicas em pacientes com COVID-19;
- III. Determinar a frequência e impacto clínico das infecções causadas pelos fungos *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* nos pacientes internados com COVID-19.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

O cálculo amostral foi baseado de acordo com os dados publicados em abril de 2020, onde foram estimados 8.682 casos confirmados de COVID-19. Aplicando o cálculo do  $n$  amostral, com margem de erro de 5% e confiabilidade de 90% obteve-se um número de 271 pacientes. Deste modo, foram testados soros de 346 pacientes hospitalizados com diagnóstico confirmado para COVID-19. Essas amostras foram oriundas dos pacientes internados no Centro Hospitalar do INI- FIOCRUZ em seu primeiro dia da hospitalização (D0). Também foram coletadas amostras no 14° dia (D14) e 21° dia de internação (D21).

Utilizamos como critérios de inclusão pacientes adultos, hospitalizados com infecção por COVID-19 confirmada por teste de RT-PCR, que estavam sob terapia com corticosteroides, intubação, ventilação mecânica e/ou suspeita de infecção fúngica.

Foi aplicado aos pacientes hospitalizados com diagnóstico confirmado de COVID-19 no INI/Fiocruz, ou aos seus familiares diretos em caso de impossibilidade de consentimento do próprio paciente, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) a partir da data de aprovação deste projeto pelo sistema CEP/CONEP. Somente foram retirados pacientes que, após assinatura do TCLE, manifestaram o desejo de não mais participar do estudo.

### 4.2. PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS, REGISTROS EDADOS DOS PACIENTES.

Foram coletados, por punção venosa, dez mililitros (ml) de sangue periférico de

cada paciente incluído no estudo, conforme foi descrito no projeto e no TCLE em tubos apropriados e após obtenção dos soros, os mesmos foram enviados ao Laboratório de Micologia do INI. Todas as amostras de soro recebidas passaram pelo processo de inativação do vírus, em banho maria sob uma temperatura de 56°C por 30 minutos e depois estocadas a -20°C até o momento da realização do teste sorológico.

Na rotina de atendimento dos pacientes foram feitos registros médicos onde eram feitos registros dos pacientes contendo dados como sexo, idade, sinais e sintomas apresentados no momento da admissão, fatores de risco como diabetes, AIDS, outras doenças imunossupressoras, uso de imunossupressor ou corticoide, entre outros. Essas informações foram obtidas no sistema de prontuários do INI-FIOCRUZ através da revisão dos prontuários dos pacientes incluídos neste estudo.

#### 4.3. Definição de casos

O critério de classificação para histoplasmose, aspergilose e candidíase foi baseado no consenso europeu EORT/MSG (DE PAUW et al., 2008) e para paracoccidiodomicose o consenso brasileiro desta doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

#### 4.4. Antígenos

Para realizar as técnicas de imunodifusão radial dupla foi utilizado o antígeno filtrado de *P. brasiliensis* (FAVA NETTO, 1961), o complexo antigênico histoplasmina (PINE et al. 1977) e o antígeno filtrado de *A. fumigatus* (COLEMAN; KAUFMAN 1972).

#### 4.4.1. Produção do antígeno filtrado de *P. brasiliensis*

O antígeno filtrado de *P. brasiliensis* foi produzido a partir da cepa Pb 339, segundo o protocolo descrito por Fava-Netto em 1961. As culturas fúngicas foram semeadas em frascos tipo Erlenmeyer contendo 250 mL de meio de cultura Fava-Netto, 1961 (proteose peptona 3g; neopeptona 10g; extrato de carne 5g; cloreto de sódio 5g; dextrose 40g; ágar bacteriológico 18g; água Milli-Q 1000mL, pH 7.2-7.0), os quais foram inoculados com a massa fúngica obtida do crescimento fúngico em dois tubos de cultura contendo meio ágar Fava-Netto mantidos entre 35°C e 37°C. Os frascos Erlenmeyer inoculados foram incubados a temperatura de 36°C por 4 semanas sob constante agitação, 150 rotações por minuto (RPM). O controle de esterilidade se deu através do plaqueamento destas culturas em meio de cultivo específico para fungos e bactérias (Brain Heart infusion-BHI) por 72 horas. Em seguida foi adicionado timerosal na concentração final de 1:10.000, os frascos foram agitados e incubados em temperatura de 36°C durante uma semana. Após esse período, as culturas foram filtradas em um pré-filtro Millipore de 0,45 µm e concentrado em 1/20 do volume original. O sobrenadante filtrado, antígeno de *P. brasiliensis*, foi concentrado através do processo de pervaporação, por meio de uma membrana de diálise com diâmetro médio de 21 mm e ponto de corte de 14 kDa, com adição de polietilenoglicol sobre sua superfície. Esse polietilenoglicol foi adicionado várias vezes até a redução de volume em 20 vezes. Após esta etapa, foi centrifugado a 2.500 rpm por 30 minutos e dialisado frente a tampão fosfato salino (PBS) (pH 7.2) também em tubo de diálise. Após a diálise, o antígeno foi distribuído em alíquotas de 1 ml em tubos tipo Eppendorf, identificado, datado e estocado a -20°C até a sua utilização.

A padronização do antígeno foi feita através de painel de diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024), frente ao soro reagente para o antígeno em questão na reação de imunodifusão (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). O título do antígeno é aquele que corresponde a mais alta diluição do mesmo que apresente reatividade nítida com o soro padrão e o mesmo número de bandas de precipitação comparada ao antígeno padrão.

#### **4.4.2. Produção do antígeno filtrado de *A. fumigatus***

Seguindo o protocolo descrito por Coleman e Kaufman em 1972 o antígeno filtrado de *A. fumigatus* foi produzido a partir da cepa Af 296 de *Aspergillus fumigatus*, cultivado em meio Agar Sabouraud (BD, Sparks, MD, EUA) por quatro semanas a 25°C, sob agitação constante de 150rpm. O controle de esterilidade foi feito através do plaqueamento em meios específicos para fungos e bactérias, meio Brain Heart Infusion (BHI) por 72 horas. Após, foi adicionado timerosal na concentração final de 1:5.000 e agitado por mais uma semana a 150rpm.

Após esta etapa, as culturas foram filtradas em papel de filtro e os sobrenadantes obtidos foram concentrados 20 vezes (1/20 do volume original), através da metodologia de concentração por pervaporação em tubo de diálise como descrito na produção do antígeno filtrado de *P. brasiliensis* até a redução do volume em 20 vezes. Em seguida, este material foi centrifugado a 2.500 RPM durante 30 minutos, realizado a diálise contra PBS (pH 7.2) e então distribuído em alíquotas de 1ml, em tubos tipo Eppendorf, identificado, datado e estocado a 4°C.

A padronização do antígeno se deu através da diluição seriada do antígeno, pela técnica da imunodifusão radial dupla com emprego do soro reconhecidamente positivo para o antígeno em questão. A padronização do soro utilizado como padrão seguiu o mesmo protocolo, realizando a diluição seriada do soro. Decorrido o tempo necessário para formação dos precipitados, procedeu-se a leitura da reação.

O título do antígeno foi aquele correspondente a mais alta diluição do mesmo que dê positividade nítida com o soro. E o do soro com reatividade frente ao antígeno

#### **4.4.3. Produção do antígeno histoplasmina (HMIN)**

Para as reações de Imunodifusão (ID) e *Western blot* (WB) os antígenos

histoplasmina (HMIN) e histoplasmina purificada (HMIN-PT) foram utilizadas como antígenos respectivamente. As bandas H e M, com 115 e 88 kDa, respectivamente, foram consideradas positivas para os antígenos H e M de *H. capsulatum*. Na ID o antígeno utilizado foi a histoplasmina na sua forma bruta. Já na técnica de WB, esse antígeno passou pelo processo de deglicosilação química com metaperiodato de sódio, como descrito previamente (ZANCOPE-OLIVEIRA et al., 1993, 1994-b). Denominaremos neste trabalho HMIN para o antígeno histoplasmina e HMIN-PT para o antígeno histoplasmina purificado e tratado com metaperiodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>).

A histoplasmina (HMIN) foi produzida a partir da cepa de *H. capsulatum* IGS 4/5 (INCQS 70308), em que *H. capsulatum* em sua fase miceliana foi inoculado em meio Smith-Asparagina e mantido em incubação a 25°C com agitação constante a 150rpm por 30 dias. Após este período, foi adicionado timerosal na diluição de 1:10.000, e a mesma permaneceu sob agitação por mais sete dias. O cultivo foi então centrifugado a 20.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana de celulose com poro de 0,45 µm. O sobrenadante resultante foi concentrado aproximadamente 20 vezes utilizando um Amicon (Millipore, Danvers, MA), célula de ultrafiltração (com um ponto de corte de 10 kDa e uma capacidade total de 200 ml) com discos de polietersulfona de ultrafiltração de agitação, utilizando N<sub>2</sub> como corrente de gás de pressão. Posteriormente o antígeno filtrado foi dialisado contra tampão salina fosfato (PBS), 0.01 M, pH 7.2 (PINE et al. 1977 modificado).

Para a purificação da HMIN por cromatografia catiônica, a HMIN resultante foi dialisada utilizando tampão citrato de sódio 0,025 M, pH 3,5, centrifugada a 20.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi aplicado em coluna (16x 100 mm) de CM- Sepharose, HiPrep CM FF 16/10 (GE Healthcare, Sweden) previamente equilibrada com tampão citrato de sódio 0,025 M, pH 3,5. O antígeno foi separado através de um gradiente descontinuo de cloreto de sódio (NaCl) preparado a partir do tampão citrato de sódio 0,025 M, pH 3,5, acrescido de 0,05 M, 0,5 M e 1 M de NaCl. As frações extraídas da coluna foram concentradas dez vezes e dialisadas contra PBS. Timerosal na diluição de 1/10.000 foi adicionado, partindo de uma solução a 1%, permanecendo em

agitação por mais sete dias. A concentração de proteínas totais foi realizada segundo a técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976) e as frações monitoradas por SDS- PAGE, para conhecimento de sua composição (ZANCOPE- OLIVEIRA et al. 1993 modificado).

O antígeno HMIN foi armazenado em alíquotas de 1mL, previamente purificado, na concentração de proteínas de aproximadamente 2,0 mg/ml. Posteriormente, as proteínas de cada alíquota de 1 ml de antígeno HMIN foram oxidadas com 200 µl de solução de metaperiodato de sódio a 100 mM, diluído em tampão acetato 0,5 M, pH 5,5 por 18 horas a 4°C em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de quantidade equimolar de glicerol por 15 minutos a 4°C. Em seguida foi adicionado 100 mM de borohidrato de sódio por duas horas a 4°C. Finalmente, a solução foi dialisada em água destilada a 4°C por 18 horas. Ao fim da diálise foi realizada uma nova dosagem de proteína do antígeno. O material foi estocado a -20°C até o momento do uso (ZANCOPE-OLIVEIRA et al. 1994b modificado).

#### 4.4.3.1 Purificação da HMIN por cromatografia de troca catiônica e deglicosilação pelo NaIO<sub>4</sub>

Os principais constituintes antigênicos da histoplasmina são os antígenos H e M. O antígeno H é uma β-glicosidase, e o antígeno M uma catalase, que ativam tanto a resposta humoral quanto a resposta mediada por células (HAMILTON et al. 1990; ZANCOPE-OLIVEIRA et al. 1993; 1994b; DEEP; DUROSE 1995). Ambos os antígenos H e M, em sua forma nativa, são glicoproteínas com peso molecular de 116 e 94 kDa respectivamente, contendo epítomos proteicos específicos e glicosídicos ligados à porção N-terminal.

A histoplasmina foi purificada e a eluição das proteínas acompanhada por espectrofotometria em um comprimento de onda de 280 nm. Então, foi realizado um “pool” das frações de maior densidade óptica (12-27). O antígeno histoplasmina foi deglicosilado pelo tratamento químico com o NaIO<sub>4</sub> (metaperiodato de sódio) e analisado por SDS-PAGE (ZANCOPE-OLIVEIRA et al. 1994a; PIZZINI et al. 1999; GUIMARÃES

et al. 2004).

#### 4.4.4 Dosagem de proteína

Foram realizadas dosagens de proteínas do antígeno histoplasmina em sua forma nativa, purificada, e purificada e tratada, empregando o micrométodo de Bradford. Foi calculada então, através da curva padrão de BSA, as seguintes concentrações: 8,70 mg/ml; 2,82 mg/ml e 0,14 mg/ml, para histoplasmina na forma nativa, purificada, e purificada e tratada, respectivamente.

A dosagem de proteínas totais do antígeno HMIN-PT foi realizada segundo a técnica descrita por Bradford (1976), modificada para utilização com reagente comercial (Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA) tendo albumina sérica bovina como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com um filtro de 595 nm de comprimento de onda.

#### 4.5. IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA DE OUCHTERLONY

A técnica de imunodifusão dupla (ID) foi realizada de acordo com a descrita por Ouchterlony (1958), esta técnica detecta a presença de anticorpos por meio da reação com precipitinas específicas H e M, trata-se de uma análise qualitativa em que se reconhece como positiva a detecção de uma ou duas linhas de precipitação, as linhas H e M. A linha H geralmente coexiste com a linha M, no entanto, é comum observar a linha M se apresentar como única. A banda H raramente é encontrada (<20%), altamente sugestiva de infecção ativa e persiste por menos tempo do que a banda M (HAGE et al., 2015).

A técnica de ID foi realizada utilizando uma lâmina de microscopia recoberta com 3,5 ml de "Agar Noble" a 1,0%, perfurada com três rosetas de sete poços cada, com cada poço medindo aproximadamente três milímetros de diâmetro. No poço central foi adicionado o antígeno, no poço superior e

inferior um soro controle e nos poços circundantes foi aplicado os soros a serem testados. O volume de amostra adicionada em cada poço foi de 8 µl.

Os soros padrões utilizados foram obtidos de pacientes com paracoccidiodomicose, histoplasmose e aspergilose com comprovação sorológica e micológica. Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida em temperatura ambiente por 48 horas. Após a incubação, as lâminas foram então deixadas em banho com solução citrato de sódio 5 % por duas horas, seguidas de 46 horas em solução salina 0,9%. Posteriormente as lâminas passaram por um processo de secagem do gel por aproximadamente cinco horas em estufa a 60°C e depois coradas durante 10 minutos com azul brilhante de Comassie R-250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 0,5% preparado em solução descorante (etanol a 40% com 10% de ácido acético) e descoradas em banhos com a solução descorante (metanola 40% com 10% de ácido acético) sob constante agitação.

A leitura das lâminas foi realizada por observação visual, na qual os soros que apresentaram linha de precipitação com identidade total com o soro padrão foram considerados soros reagentes.

Este método foi utilizado ainda para a padronização da histoplasmina, filtrado de cultura de *P. brasiliensis* e filtrado de cultura de *A. fumigatus*, no qual foi realizada uma diluição seriada, a fim de verificar a melhor formação da linha de precipitação e desta forma, determinar até que título estes antígenos seriam capazes de reagir com os anticorpos de *H. capsulatum*, *P. brasiliensis* e *A. fumigatus*.

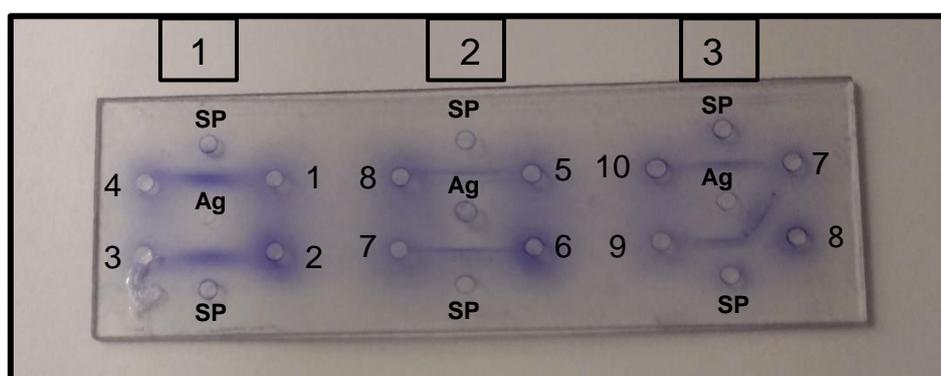


Figura 8: Esquema da técnica de ID, mostrando que na roseta 3, o soro de paciente número 8 apresentou resultado positivo no teste de ID por formar uma linha de precipitação em gel entre o soro testado e o antígeno da micose em questão. Ag- Antígeno histoplasmina; Sp- Soro padrão; 1,2,3,5,6,7,9,10 Soros não reagentes e 8- Soro reagente

## 4.6. MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS

### 4.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica foi utilizada tanto para análise do antígeno HMIN e HMIN-PT, quanto para realização das reações de Western blot, a qual seguiu metodologia descrita por Laemmli (1970). Foi empregado um sistema que consiste em gel de empilhamento na concentração a 4,0% e gel de separação a 10,0% de acrilamida/bisacrilamida, utilizando um sistema vertical Bio Rad Mini Protean II (Bio Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA). Para a corrida eletroforética foi utilizado HMIN-PT, na concentração de 0,25 µg de proteína por milímetro do pente utilizado, diluída em proporções iguais de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contendo 5,0% de 2-mercaptoetanol e 2,0% de dodecil sulfato de sódio (SDS). A amostra foi então fervida a 100°C por três minutos para desnaturação das proteínas. Por fim foi adicionado o corante marcador de corrida (“tracking dye”) na relação de 3 ul para cada 100 µl da amostra. Foram utilizados padrões de massas moleculares pré-corados para monitoramento da corrida eletroforética e comparação da migração relativa das bandas separadas pela eletroforese. Para início da corrida eletroforética foi aplicada uma corrente de 25 mA, mantida até as amostras entrarem uniformemente no gel de separação, quando então a corrente foi aumentada para 30 mA. A reação foi finalizada quando o corante marcador da corrida atingiu a base do gel de separação.

### 4.6.2. *Western blot*

Após realizar a eletroforese dos antígenos HMIN-PT, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 µm (Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA). A técnica utilizada foi a descrita por Pizzini e colaboradores (1999) e validada por Almeida e colaboradores (2016) empregando-se uma cuba de eletroforese (Mini-transblot cell, Bio-Rad, Laboratories Richmond, CA, EUA).

A membrana foi cortada em tiras de aproximadamente três mm de largura, as quais foram utilizadas nas reações imunoenzimáticas. Inicialmente, cada tira contendo os antígenos foi colocada em compartimentos de uma placa específica e incubada por uma hora, a temperatura ambiente sob agitação constante em TBS-T (TBS + 0,2% Tween 20 pH 7,5) contendo 5,0% de leite desnatado, a fim de bloquear possíveis ligações inespecíficas. Essas tiras foram então lavadas três vezes com TBS-T, cinco minutos para cada lavagem. Logo após, as amostras de soro foram diluídas (1:100) em TBS-TL (TBS-T + 5,0% leite desnatado) e incubadas com as tiras por uma hora sob agitação constante. Posteriormente as tiras foram lavadas 3 vezes com TBS-T, cinco minutos para cada lavagem. Após a lavagem, IgG de cabra anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch, EUA), foi adicionado nas tiras de nitrocelulose na diluição de 1:3.000 em TBS-TL, e incubado por uma hora a temperatura ambiente sob agitação constante. Após outras três lavagens com TBS-T, por cinco minutos cada lavagem, a reação foi revelada adicionando-se uma solução contendo 1 ml de BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolil-fosfato) e 1 ml de NBT (azul de nitro tetrazolium) para cada 100 ml de tampão diluente do substrato (Tris HCl 0,1 M pH 9,5 / 0,1 M NaCl — 5 mM MgCl<sub>2</sub> + 6 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (AP Conjugate Substrate Kit - Bio-Rad Laboratories, EUA).

Após o aparecimento da cor, as tiras de membrana foram lavadas exaustivamente em água destilada a fim de parar a reação. As bandas H e M, com 115 e 88 kDa, respectivamente, foram consideradas positivas para os antígenos H e M de *H. capsulatum*. Como controle positivo foi utilizada amostra de soro de um paciente com histoplasmose comprovada previamente por cultura e como controle negativo, o soro de uma pessoa sem histoplasmose. Os resultados foram obtidos através da leitura visual, comparando as reações obtidas das amostras com as encontradas na tira controle.

#### **4.6.3. ELISA para detecção de anticorpos anti-*Aspergillus***

O método imunoenzimático utilizado para detecção de anticorpos anti-IgG de *Aspergillus* foi o kit comercial PLATELIA™ *Aspergillus* IgG Ab plus.

As amostras de soro foram diluídas em tampão contendo Tris-NaCl - Tween® 20 a 0,1%, vermelho de fenol e conservante ProClin™300 <1,5% na proporção de 10 µl de amostra de soro para 190 µl do tampão em uma placa de microdiluição em polipropileno. Desta primeira diluição, 10 µl foram adicionados nas microplacas sensibilizadas com o antígeno recombinante purificado de *Aspergillus* do próprio *kit* com um volume de 190 µl do reagente R7b (Tris-NaCl - Tween® 20 a 0,1%, púrpura de bromocresol e conservante ProClin™300 <1,5%). As placas foram então incubadas a 37°C por 60 minutos. Após a incubação, as placas foram lavadas 2 vezes com a solução contendo Tris-NaCl (pH 7,4), Tween® 20 a 2% e Conservante: ProClin™300 para retirar todo material não fixado. O conjugado (anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgG humana marcado com peroxidase) foi adicionado (200µl) em cada poço das microplacas e incubado a 37°C por mais 60 minutos. As placas foram lavadas por mais 4 vezes com 200 µl de solução de lavagem para retirar todo o material não fixado. A adição de 200 µl do cromógeno (solução de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (<1,0%) contendo o substrato da peroxidase e a incubação à temperatura ambiente por 30 minutos permitiram a revelação dos complexos eventualmente formados. A reação enzimática foi parada pela adição de ácido sulfúrico 1N. A leitura da densidade óptica foi efetuada em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm, com referência do comprimento de onda de 620nm.

A interpretação dos resultados seguiu as orientações contidas na bula do *kit*.

Amostas com concentrações inferiores a 5 UA/ml ( $C < 5$ ) foram consideradas negativas quanto a presença de anticorpos IgG anti-*Aspergillus*; amostras com concentrações iguais ou maiores que cinco e inferiores a dez ( $5 \leq C < 10$ ) foram consideradas intermediárias, e amostras com concentrações iguais ou superiores a 10 UA/ml foram consideradas positivas quanto à presença de anticorpos IgG anti-*Aspergillus*.

#### **4.6.4. ELISA para detecção de anticorpos anti-*Candida***

O *kit* comercial BioRad Platelia™ *Candida* Ab Plus, foi o método de

ensaio imunoenzimático utilizado para a detecção de anticorpos Ig totais antimanano anti- *Candida* no soros humanos do estudo.

As amostras de soro foram pré- diluídas a 1/20 em tampão diluente de amostras (tampão Tris-NaCl - Tween® 20 a 0,1%, Vermelho de fenol e Conservante ProClin™300 <0,151%) em uma placa de diluição. Foram pipetadas 190 µl de diluente de amostras 2 (R7b) nos poços da microplaca destinados a receber as amostras e em seguida adicionado 10 µl das amostras pré-diluídas a 1/20, misturando delicadamente. Após a amostra ter sido diluída, foram adicionados 10 µl nas microplacas sensibilizadas com antígeno manano purificado a partir de *Candida albicans* do próprio *kit* e 190 µl do reagente R7b, um diluente composto por tampão Tris-NaCl - Tween® 20 a 0,1%%, púrpura de bromocresol e conservante ProClin™300 <1,5%. A placa foi então incubada a 37°C por 60 minutos. Após este tempo, a placa foi lavada com 200µl da solução contendo tampão TRIS-NaCl (pH 7,4) , Tween® 20 a 2% e Conservante: ProClin™300 para retirar todo material não fixado.

O volume de 200ul do conjugado (anticorpo monoclonal de cabra anti-IgG humanas marcado com peroxidase) foi adicionado a cada poço da microplaca e incubado a 37°C por mais 60 minutos. As microplacas foram lavadas por mais 4 vezes com 200 µl de solução de lavagem para retirar todo o material não fixado. A adição de 200µl cromógeno (Solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (<1,0%) contendo o substrato da peroxidase e a incubação à temperatura ambiente por 30 minutos permitiram a revelação dos complexos eventualmente formados. A reação enzimática foi parada pela adição de ácido sulfúrico 1N. A leitura das densidades óticas foi efetuada com um espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm, com referência do comprimento de onda de 620nm.

A interpretação dos resultados seguiu as orientações contidas na bula do kit. Amostras com concentrações inferiores a 5 UA/ml ( $C < 5$ ) foram consideradas negativas quanto a presença de anticorpos IgG anti-*Aspergillus*; amostras com concentrações iguais ou maiores que cinco e inferiores a dez ( $5 \leq C < 10$ ) foram consideradas intermediárias, e amostras com concentrações iguais ou superiores a 10 UA/ml foram consideradas “positivas” quanto à presença de anticorpos IgG anti-*Candida*.

#### 4.7. PLANO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes qui-quadrado ou exato de Fisher foram usados para correlacionar os dados dos pacientes e os resultados da detecção de anticorpos para cada micose. Curvas de sobrevida foram construídas e analisadas pelo método de Mantel-Cox. O software GraphPad Prism 9 foi utilizado para as análises e foi adotado nível de significância de 5%.

#### 4.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todas as amostras clínicas e metodologias empregadas fazem parte de um estudo maior intitulado “Diagnóstico diferencial de doenças fúngicas e bacterianas na COVID-19”, o qual foi submetido e aprovado pelo CEP do INI/FIOCRUZ, CAAE 31578820.9.0000.5262.

## 5. RESULTADOS

Foram incluídos no estudo um total 346 pacientes internados no Centro Hospitalar do INI/Fiocruz, com diagnóstico de COVID-19 comprovada por exame de RT-PCR, no período de setembro de 2020 a fevereiro de 2021, e que preencheram os critérios estabelecidos previamente em nossa pesquisa. Foram analisadas 346 amostras de soro coletados no primeiro dia de internação (D0), 84 amostras D14 e 61 amostras D21, totalizando 491 amostras testadas para detecção de anticorpos.

### 5.1 ANTÍGENOS

O antígeno histoplasmina produzido como descrito anteriormente por Pine e colaboradores (1977), com pequenas modificações e testado pelo método de imunodifusão dupla, apresentou positividade até a titulação de 1/8. O mesmo procedimento foi realizado para a padronização dos antígenos filtrados de cultura de *P. brasiliensis* e *A. fumigatus*, que apresentaram reatividade até as diluições de 1/128 e 1/2 respectivamente.

### 5.2 IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA (ID)

Das 346 amostras testadas pelo método da Imunodifusão, sete apresentaram anticorpos anti-*Histoplasma* (2,02%), caracterizadas pela presença de uma linha de precipitação (Figura 10). Quando tituladas, as mesmas apresentaram títulos de reatividade variando entre 1/1 e 1/8. Todos os soros dos pacientes reagentes à HMIN na imunodifusão, também foram positivos na técnica de *Western blot*. Já ao avaliar a presença de anticorpos anti-*Paracoccidioides* e anti-*Aspergillus* nenhuma das amostras testadas apresentou reatividade pelo método da Imunodifusão.

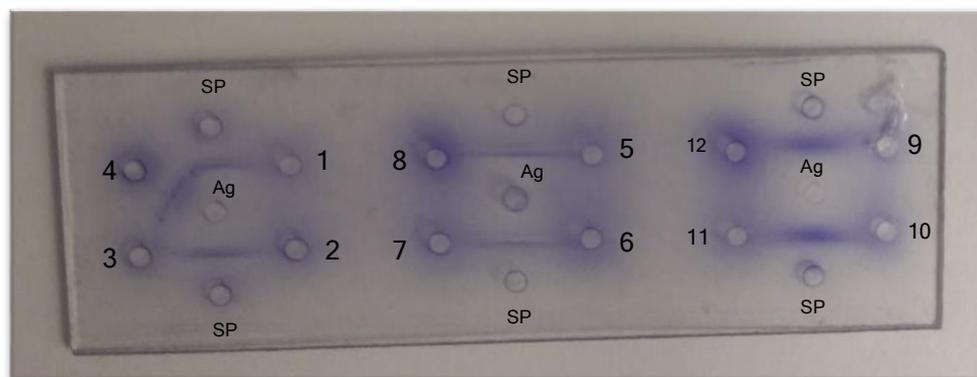


Figura 9: Demonstrativo da reatividade dos soros frente ao antígeno histoplasmina pela técnica de Imunodifusão dupla de Ouchterlony. Ag- Antígeno histoplasmina; Sp- Soro padrão; 1,2,3,5,6,7,8,9,10,11 e 12 Soros não reagentes e 4 - Soro reagente.

### 5.3 MÉTODOS IMUNOENZIMÁTICOS

#### 5.3.1 *Western blot* para detecção de anticorpos anti-*Histoplasma*

Ao analisarmos a detecção de anticorpos anti-*Histoplasma* pelo WB, 45 amostras de soro foram reagentes (13%). Das amostras reagentes, 23 apresentaram reatividade frente ao antígeno M, 19 aos dois antígenos (H e M) (figura 11) e três reconheceram somente o antígeno H.

O gênero masculino foi predominante neste estudo com 195 (56,3%) homens e 151 mulheres (43,6%) (p-valor= 0.0131). Dentre o grupo de 6 pacientes que vivem com HIV, 5 (83,3%) são do sexo masculino.



Figura 10: Tiras de membrana de nitrocelulose do teste de WB, revelando as bandas no controle positivo (C+), a positividade em algumas amostras (709, 727, 732 e 748 e ausência de bandas nas amostras negativas (726, 728, 731, 734, 738, 742, 766, 768 e 771). PM — Peso molecular. Números à esquerda correspondem ao padrão de peso molecular.

Quanto á variável sexo dos pacientes avaliados para a presença de anticorpos anti-*Histoplasma* pelo método de WB, o gênero masculino apresentou maior prevalência, apresentando significancia estatística ( $p=0,0131$ ) (Gráfico 1).

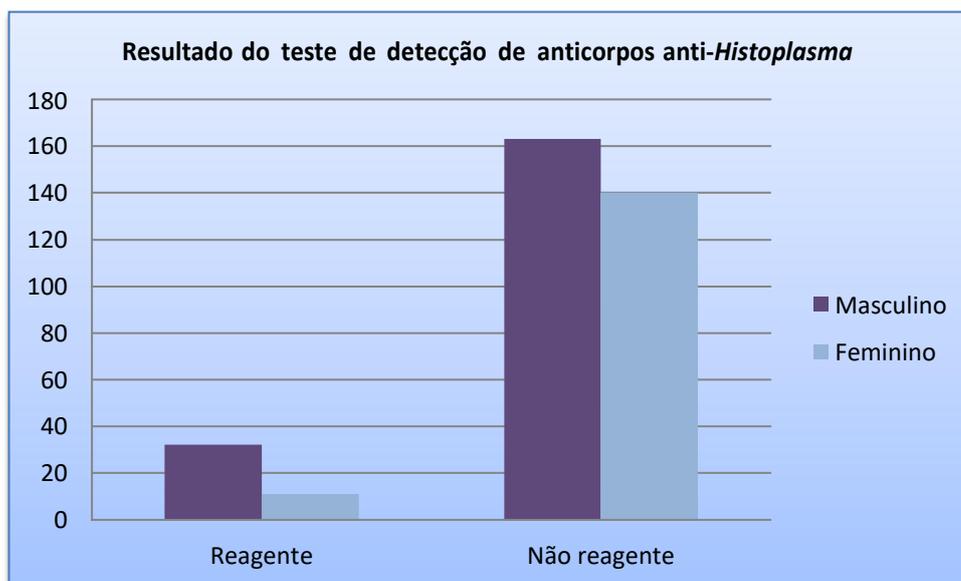


Gráfico 1: Distribuição da variável do sexo dos pacientes testados para detecção de anticorpos anti-*Histoplasma* por *Western blot*.

Dentre o universo de 346 pacientes do estudo onde 45 foram reagentes para anticorpos anti-*Histoplasma*, seis (13,3%) são pessoas que vivem com HIV. Desses seis, dois (33,3%) apresentaram reatividade anticorpos anti-*Histoplasma*, um com a presença apenas da banda M e o outro com a presença de ambas as bandas H e M. O paciente que apresentou apenas a banda M recebeu alta enquanto o paciente que apresentou as duas bandas veio a óbito.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO WESTERN BLOT

A sensibilidade foi calculada considerando os resultados obtidos, onde 45 amostras foram positivas no *Western blot* e dessas, apenas sete demonstraram reatividade na Imunodifusão, calculamos com isso um número de 38 falsos negativos para anticorpos anti-*Histoplasma* na técnica de Imunodifusão.

A tabela 1 apresenta as características clínicas dos pacientes reagentes no teste de WB para detecção de anticorpos anti-*Histoplasma* para esta análise, apenas a variável uso de catéter periférico apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos.

**Tabela1: Características clínicas dos pacientes testados para a detecção de anticorpos anti-Histoplasma**

Variáveis		Anticorpos anti- <i>Histoplasma</i>		P-valor
		Detectável (N=43)	Não detectável (N=303)	
Febre	Sim	20 (5.78%)	168 (48.5%)	0,3267
Saturação de O2	< 95%	16 (4.62%)	128 (36.7%)	0,6208
Tosse	Sim	31 (8.95%)	193 (55.8%)	0,3107
Dor no peito	Sim	1 (0.28%)	18 (5.20%)	0,4879
Coriza	Sim	1 (0.28%)	17 (4.91%)	0,7106
Dispneia	Sim	31 (8.95%)	246 (71.1%)	0,1596
Dor de garganta	Sim	2 (0.57%)	9 (2.60%)	0,6336
Perda do olfato	Sim	5 (1.44%)	30 (8.68%)	0,5879
Perda do paladar	Sim	1 (0.28%)	24 (6.94%)	0,3396
Diarreia	Sim	7 (2.02%)	31 (8.95%)	0,8195
Dor abdominal	Sim	1 (0.28%)	7 (2.02%)	1,0000
Náuseas	Sim	3 (0.86%)	13 (3.75%)	0,4351
Cefaleia	Sim	4 (1.15%)	38 (10.1%)	1,0000
Mialgia	Sim	8 (2.31%)	77 (22.2%)	0,4488
Diabetes	Sim	15 (4.33%)	108 (31.2%)	0,3143
HIV	Sim	2 (0.57%)	4 (1.15%)	0,1637
Catéter periférico	Sim	11 (3.18%)	98 (28.3%)	1,0000
Desfecho	Óbito	13 (3.75%)	100 (28.9%)	0,8623

**LEGENDA:** Características clínicas e sociais de pacientes reagentes a detecção de anticorpos anti-*Histoplasma* (sim) e os não reagentes a detecção de anticorpos anti-*Histoplasma* (não).

Em relação à idade dos pacientes avaliados para presença de anticorpos anti- *Histoplasma* pelo método de WB, as faixas etárias dos grupos de pacientes positivos (41-89 anos) e negativos (26-90 anos) são bem similares, não apresentando significância estatística ( $p=0,1348$ ).

Ao avaliar a variável sexo dos pacientes reagentes para a presença de anticorpos anti-*Histoplasma* que apresentaram apenas a banda M com os que apresentaram ambas as bandas H e M pelo método de WB, o gênero masculino apresentou maior prevalência, mas não apresentou significancia estatística ( $p=0,1795$ ) (Gráfico 2).

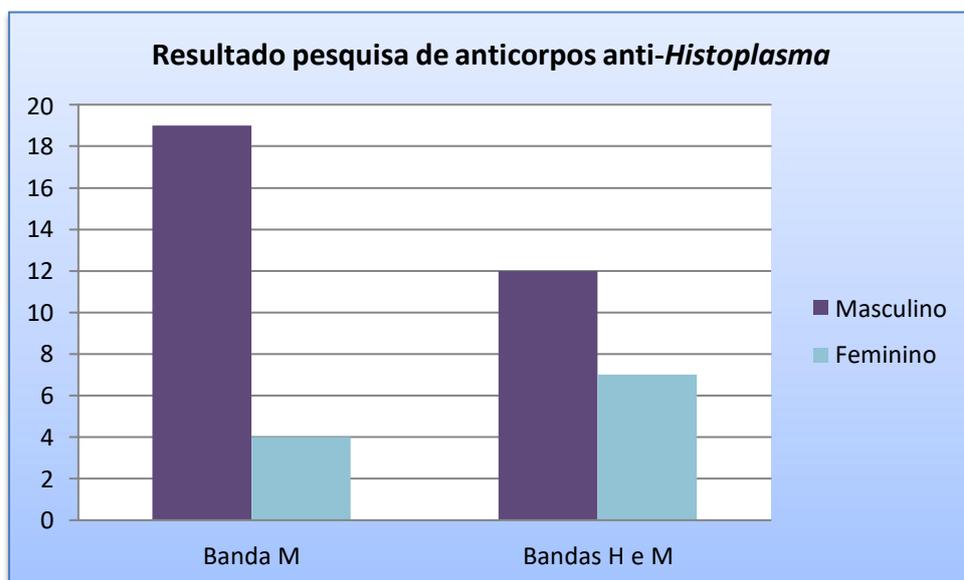


Gráfico 2: Distribuição da variável do sexo dos pacientes reagentes para detecção de anticorpos anti-*Histoplasma* por *Western blot*.

As amostras analisadas no estudo foram provenientes de pacientes hospitalizados na unidade de terapia intensiva (UTI) e ao analisar e comparar a curva de sobrevida entre pacientes soro-reagentes e não reagentes para anticorpos anti- *Histoplasma* com o desfecho clínico ao longo de 250 dias, foi observado que não houve diferença estatística entre pacientes com e sem anticorpos anti-*Histoplasma* ( $P = 0,3971$ ) (Gráfico 3).

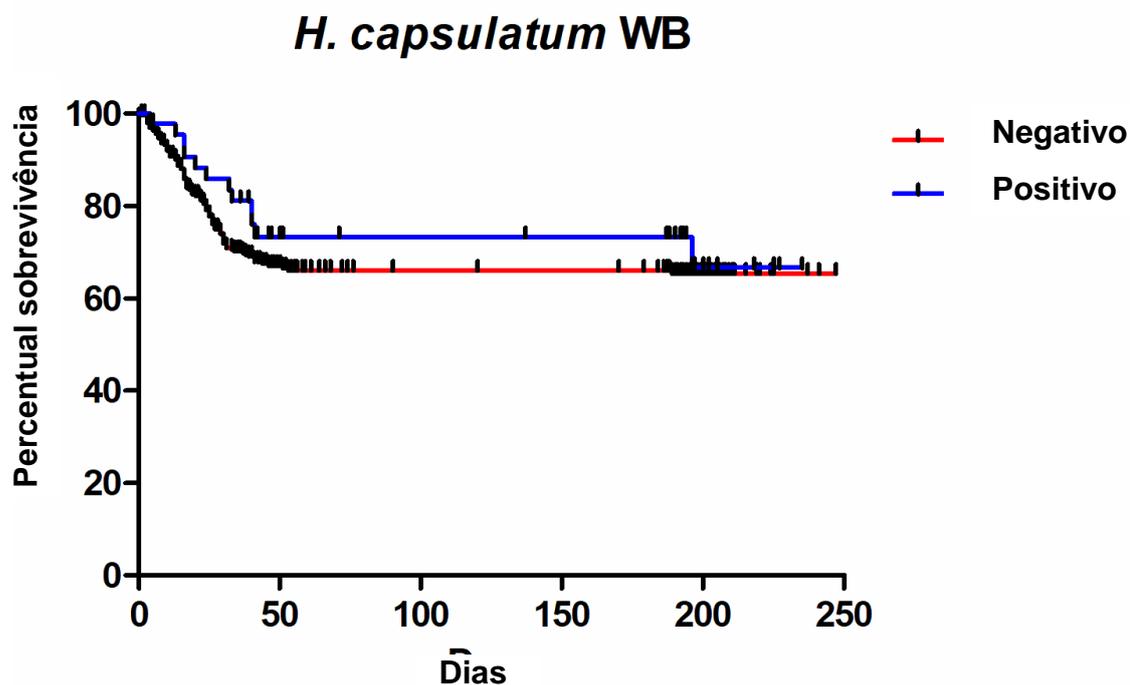


Gráfico 3: Curva de sobrevivência dos pacientes avaliados para detecção de anticorpos anti-*Histoplasma*

E ao compararmos aqueles que apresentaram reatividade anti-*Histoplasma* identificando apenas o antígeno M com os que identificaram ambos os antígenos (H e M), percebemos que também não houve diferença estatística entre presença ou ausência de banda H ( $P = 0.0952$ ) (Gráfico 4).

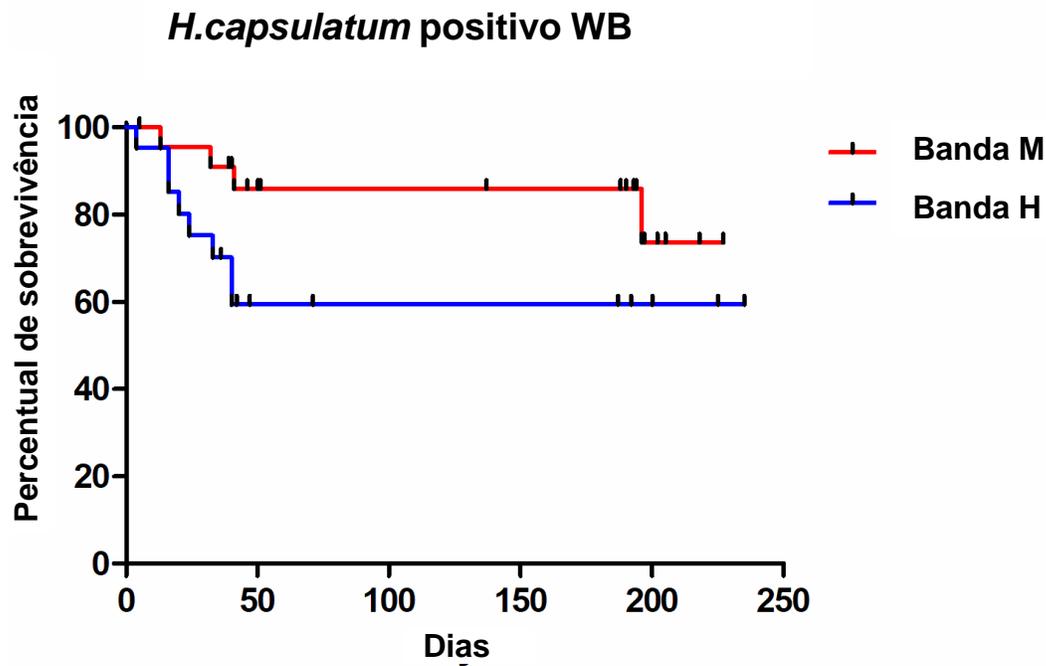


Gráfico 4: Curva de sobrevida em pacientes anti- *Histoplasma* positivos.

A tabela 2 apresenta as variáveis dos pacientes com teste de WB positivos, comparando os resultados dos que apresentaram as bandas H e M com os que só revelaram a banda M. Para esta análise, apenas a variável uso de catéter periférico apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos.

**Tabela 2:** Características clínicas dos pacientes com teste de *Western blot* positivos

		<u>Anticorpos positivos Anti-Histoplasma</u>		
Variáveis		Banda M (N=22)	Bandas H e M (N=19)	P-valor
Febre	Sim	10 (5.78%)	9 (48.5%)	1,0000
Saturação de O2	< 95%	8 (4.62%)	7 (36.7%)	1,0000
Tosse	Sim	18 (8.95%)	11 (55.8%)	0,1647
Dor no peito	Sim	0 (0.28%)	1 (5.20%)	0,4634
Coriza	Sim	0 (0.28%)	1 (4.91%)	0,4634
Dispneia	Sim	15 (8.95%)	14 (71.1%)	0,7437
Dor de garganta	Sim	1 (0.57%)	1 (2.60%)	1,0000
Perda do olfato	Sim	3 (1.44%)	2 (8.68%)	1,0000
Perda do paladar	Sim	1 (0.28%)	0 (6.94%)	1,0000
Diarreia	Sim	5 (2.02%)	2 (8.95%)	0,4192
Dor abdominal	Sim	0 (0.28%)	0 (2.02%)	1,0000
Náuseas	Sim	0 (0.86%)	3 (3.75%)	0,0909
Cefaleia	Sim	2 (1.15%)	2 (10.1%)	1,0000
Mialgia	Sim	4 (2.31%)	4 (22.2%)	1,0000
HIV	Sim	1 (0.57%)	0 (0,00%)	1,0000
Diabetes	Sim	6 (4.33%)	8 (31.2%)	0,3458
Ventilação mecânica	Sim	8 (5.78%)	11 (38.7%)	0,2169
Catéter periférico	Sim	9 (3.18%)	2 (28.3%)	<b>0,0385</b>
Desfecho	Óbito	5 (3.75%)	6 (28.9%)	0,7254

**Legenda:** Características clínicas e sociais de pacientes reagentes a detecção de anticorpos anti-*Histoplasma*, comparando as variáveis dos pacientes que no teste de *Western blot* reagiram somente a precipitina M e as que reagiram as precipitinas H e M.

Quando comparamos a sensibilidade dos dois testes sorológicos, ID e WB foi observado um ganho na sensibilidade quando utilizado o método de WB. E ainda, quando positivos nos dois métodos, o WB apresentou uma capacidade de detecção de anticorpos contra o antígeno H maior que o da ID.

#### 5.5. ELISA para detecção de anticorpos anti-*Aspergillus*

Um paciente apresentou reatividade para a detecção de anticorpos anti-*Aspergillus* pelo teste de ELISA. Essa amostra foi coletada no tempo D0, ou seja, no dia em que a paciente foi internada. Paciente do sexo feminino, com 79 anos de idade, com histórico prévio de diabetes. Na tomografia computadorizada de tórax foi observada imagem compatível com derrame pleural e padrão vidro fosco, padrão frequentemente observado em pacientes com aspergilose e COVID-19.

A paciente apresentou como sintomas clínicos febre, saturação de oxigênio abaixo de 95%, diarreia e náuseas. A paciente não fez uso de antifúngico ao longo da internação e recebeu alta após 12 dias de internação.

Quando testamos as amostras de soro dos pacientes nos tempos D14 e D21 nenhuma amostra apresentou reatividade para anticorpos anti-*Aspergillus* na técnica de ELISA. A paciente com reatividade positiva no D0, não coletou amostras nos tempos D14 e D21, pois recebeu alta após 12 dias de internação.

Adicionalmente, foi feito o teste de detecção do antígeno pela técnica LFA-*Aspergillus* da amostra D0 da paciente com reatividade positiva, para sugerir uma infecção ativa por *Aspergillus*, mas o resultado foi negativo, com index encontrado de 0,01 DO (densidade óptica).

#### 5.6. ELISA para detecção de anticorpos anti-*Candida*

Durante o período do estudo, as análises da detecção de anticorpos anti-*Candida*

nas 350 amostras de soros resultou em 115 amostras positivas (32,85%), 199 negativas (55,42%) e 36 consideradas intermediárias (10,28%) para a presença de anticorpos anti-*Candida*. Para análise dos resultados, consideramos amostras com resultados positivos, e as amostras negativas e intermediárias foram agrupadas e denominadas como não positivas.

A comparação entre as características clínico-sociais dos pacientes quanto à presença ou não de anticorpos está descrita na Tabela 3.

**Tabela 3:** Características clínico-sociais dos pacientes testados para detecção de anticorpos anti-*Candida*

Variáveis		Anticorpos anti- <i>Candida</i>		P-valor
		Detectável (N=118)	Não detectável (N=228)	
Febre	Sim	57 (16.5%)	132 (38.1%)	0,1106
Saturação de O <sub>2</sub>	< 95%	51 (14.7%)	93 (26.9%)	0,7302
Tosse	Sim	67 (19.4%)	158 (45.7%)	<b>0,0240</b>
Dor no peito	Sim	11 (3.18%)	8 (2.3%)	<b>0,0431</b>
Coriza	Sim	7 (2.02%)	11 (3.18%)	0,7990
Dispneia	Sim	93 (26.9%)	185 (53.5%)	0,6689
Dor de garganta	Sim	4 (1.15%)	7 (2.02%)	1,0000
Perda do olfato	Sim	9 (2.6%)	26 (7.5%)	0,3477
Perda do paladar	Sim	6 (1.7%)	19 (5.5%)	0,3811
Diarreia	Sim	11 (3.18%)	27 (7.8%)	0,5873
Dor abdominal	Sim	1 (0.28%)	7 (2.02%)	0,2731
Náuseas	Sim	8 (2.31%)	11 (3.18%)	0,4625
Cefaleia	Sim	13 (3.45%)	29 (8.4%)	0,7300
Mialgia	Sim	28 (8.09%)	57 (16.5%)	0,8953
HIV	Sim	2 (0,56%)	4 (1.15%)	1,0000
Ventilação mecânica	Sim	56 (16.2%)	98 (28.3%)	0,4937
Catéter periférico	Sim	35 (10.1%)	75 (21.7%)	0,6263
Desfecho	Óbito	50 (14.4%)	63 (18.2%)	<b>0,0076</b>

**Legenda:** Características clínicas e sociais de pacientes que foram reagentes a detecção de anticorpos anti-*Candida* (sim) e os que foram não reagentes a detecção de anticorpos anti-*Candida* (não).

Em relação à idade dos pacientes avaliados para presença de anticorpos anti- *Candida*, os grupos de pacientes positivos (32-91 anos) e não positivos (26-89 anos) são bem similares, não apresentando significância estatística ( $P=0,1467$ ).

Quanto ao gênero dos pacientes avaliados quanto ao teste de detecção de anticorpos anti-*Candida* pelo teste ELISA, o sexo feminino apresentou maior prevalência, com significância estatística ( $p=0,0029$ ) (Gráfico: 5).

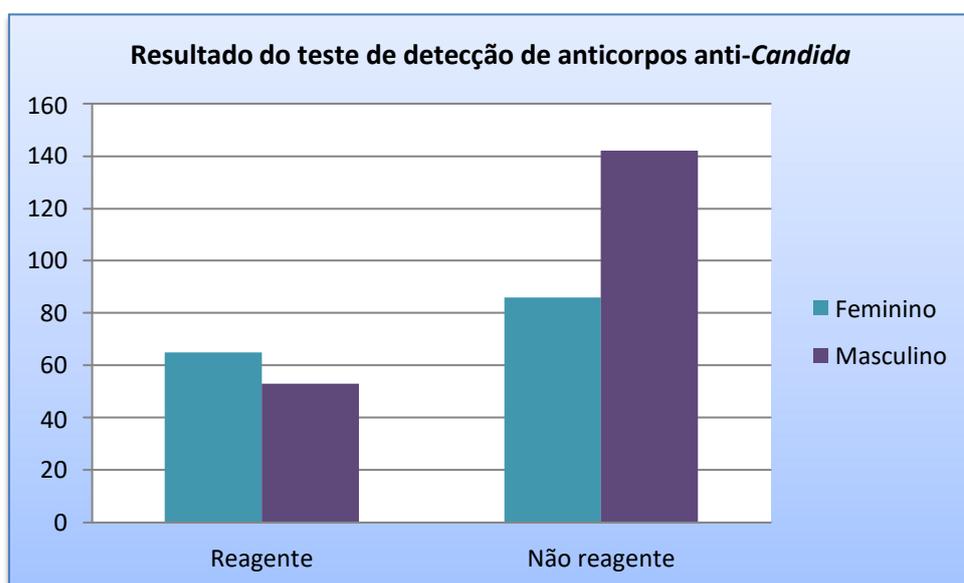


Gráfico 5: Distribuição da variável do sexo dos pacientes reagentes para detecção de anticorpos anti-*Candida* por ELISA.

Como dito anteriormente as amostras analisadas no estudo foram provenientes de pacientes hospitalizados na UTI e coletadas no seu primeiro dia de internação. Ao analisar e comparar a curva de sobrevida entre pacientes positivos e negativos para anticorpos anti-*Candida* (gráfico 6), com o desfecho clínico ao longo de 250 dias, foi observado que 45% dos pacientes com resultado de sorologia positiva para *Candida* spp foram a óbito ou seja, a curva de sobrevivência decaiu mais nos positivos do que no negativo sugerindo que pacientes com candidíase, e com tempos prolongados de internação em UTI contribuíram para o óbito dos pacientes com COVID-19. Esse

resultado apresentou significância estatística entre positivos e negativos, com P-valor =0.0002) pelo teste de Mantel-Cox.

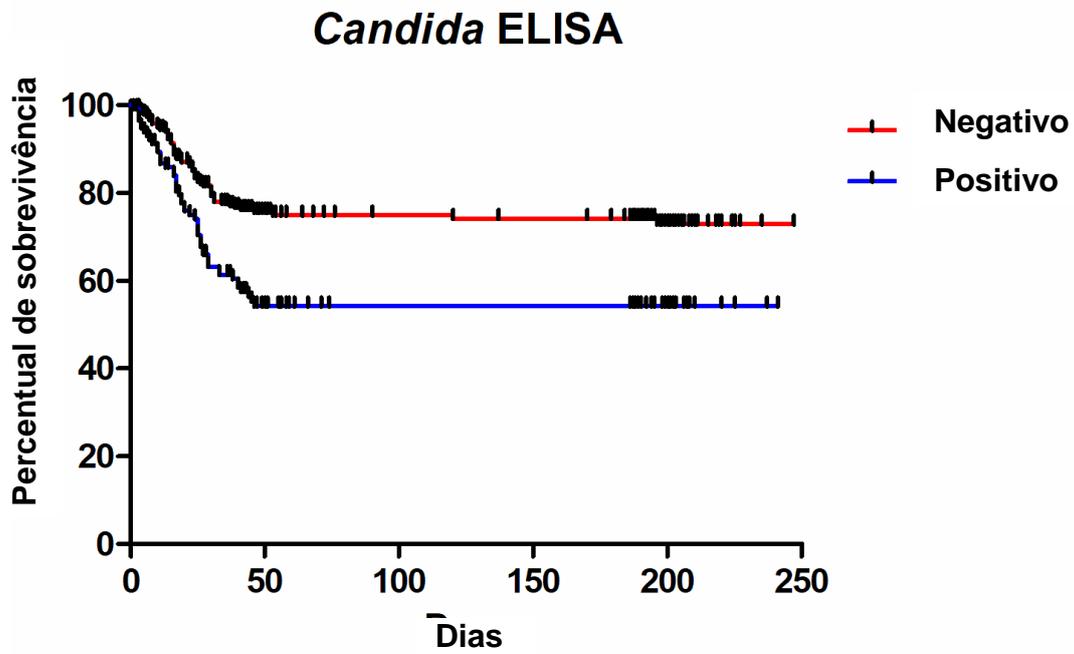


Gráfico 6: Curva de sobrevida anti-*Candida*

## 6. DISCUSSÃO

As doenças fúngicas levam a óbito mais de 1,5 milhão e atingem mais de um bilhão de pessoas no mundo anualmente. No entanto, ainda são doenças negligenciadas pelas autoridades de saúde pública, mesmo que a maioria das mortes por doenças fúngicas seja evitável. Infecções fúngicas graves costumam ocorrer devido a outros problemas de saúde, incluindo asma, pessoas que vivem com HIV, câncer, transplante de órgãos e terapias com corticosteróides. Neste cenário, o diagnóstico precoce e preciso permitiria uma terapia antifúngica imediata. Mas ainda assim o diagnóstico é muitas vezes atrasado ou indisponível, ocasionando a morte ou causando a doença crônica grave (BONGOMIN et al., 2017).

Sabe-se que existem coinfeções ou infecções secundárias relacionadas com pneumonia viral causada por diferentes agentes. Uma revisão sistemática revelou que um em cada quatro pacientes com infecção por H1N1 foi acometido por infecção bacteriana/fúngica, durante a pandemia de 2009 (MACINTYRE et al., 2018). Com a COVID-19 não foi diferente. Uma infinidade de coinfeções bacterianas e fúngicas foram relatadas em pacientes com COVID-19 (LANSBURY L et al., 2020).

A COVID-19 eleva os níveis de inflamação nos pacientes e isso acarreta em uma alta liberação de citocinas inflamatórias no organismo e, conseqüentemente, consideráveis danos nos tecidos do corpo do infectado. Os níveis de citocinas inflamatórias elevadas, principalmente a interleucina-6 (IL-6), foram associados à lesão pulmonar grave em pacientes coinfectados (RUBIN et al., 2021). Esta situação pode ser um fator de risco para infecções fúngicas de acometimento pulmonar e aumentar a possibilidade de que um quadro que geralmente é assintomático tornar-se sintomático (NARGESI et al., 2021). Além disso, poderia aumentar a possibilidade de reativações secundárias de micose latente. Sendo assim, é de extrema importância levar em consideração o endemismo das micoses, levantar suspeitas do seu diagnóstico e realizar diferentes testes para diagnosticar os pacientes corretamente. Inevitavelmente, no início da pandemia de COVID-19, todas as atenções estavam voltadas para os

casos desta doença, e com isso, poucos testes diagnósticos diferenciais foram realizados, o que certamente levou ao atraso ou subdiagnóstico de outras patologias infecciosas, principalmente nas micoses que comumente já são negligenciadas (NARGESI et al., 2021; RODRIGUEZ et al., 2020).

Na América Latina, muitos países com seus sistemas de saúde saturados, todo o foco foi dado ao diagnóstico e tratamento da COVID-19. Mesmo muitas mortes relatadas causadas pelo COVID-19 não foram informadas considerando sua coinfeção (MESSINA et al., 2022).

As infecções fúngicas estão entre as principais infecções entre pacientes imunocomprometidos (BROWN et al., 2012). Um aumento considerável nas taxas de incidência e mortalidade de infecções fúngicas foi relatado entre pacientes com COVID-19, especialmente naqueles que receberam terapias imunossupressoras ou que apresentam comorbidades subjacentes (CAFARDI et al., 2021).

A histoplasmose é uma micose endêmica com casos descritos nos cinco continentes, com áreas de alta endemicidade localizadas nos vales dos rios Ohio e Mississippi nos EUA, e em grande parte da América Latina (COUPPIÉ et al., 2006; COLOMBO et al., 2011). No Brasil, a histoplasmose é uma das infecções fúngicas sistêmicas mais comuns, com casos descritos em todas as regiões do país. Revisão sistemática realizada por nosso grupo aponta como detaque os Estados do Ceará, Rio de Janeiro, Goiás e Rio Grande do Sul com maior número de casos reportados na literatura (ALMEIDA et al., 2019).

Em nosso estudo, dos 346 pacientes testados, 45 apresentaram anticorpos anti- *Histoplasma*, revelando uma frequência de 13%. Fato justificável, visto que o estado do Rio de Janeiro, onde residem os pacientes participantes deste estudo, apresenta áreas com altos índices de infecção, sendo consideradas endêmicas ou hiperendêmicas (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; MUNIZ; WANKE 2013). Ao analisarmos as variáveis clínicas e sociais, apenas a variável sexo apresentou estatística significativa ( $P= 0.0232$ ), revelando predomínio do sexo masculino. Tal fato é suportado pela literatura, que aponta constantemente um predomínio do sexo masculino entre as pessoas acometidas por histoplasmose (ALMEIDA et al., 2019; DINGLE et al., 2021).

A histoplasmose pode surgir como uma infecção oportunista em pessoas que vivem com HIV e deveria ser incluída entre as doenças com diagnósticos

diferenciais em pacientes imunodeprimidos, acometidos ou não pela COVID-19. Geralmente a infecção oportunista por histoplasmose ocorre quando os números de células CD4+ estão abaixo de 150 células/mm e suas taxas de prevalência variam grandemente. O índice de mortalidade da histoplasmose associada a AIDS varia entre 20% a 70%, de acordo com estudos realizados em países em desenvolvimento. Tal literatura embasa o resultado do nosso estudo, onde dos 45 pacientes reagentes positivos para COVID-19 e reagentes para anticorpos anti-*Histoplasma* dois (33,3%) são pessoas que vivem com HIV (p-valor 0,1637) e um desses dois pacientes veio a óbito (50%).

Diferentes metodologias são empregadas no diagnóstico da histoplasmose, e embora o padrão ouro ainda seja o histopatológico, o isolamento do fungo em cultura de espécimes clínicos muitas vezes apresenta baixa sensibilidade (AZAR et al., 2015). Desta forma, os testes sorológicos surgem como importantes ferramentas auxiliares para o diagnóstico da histoplasmose.

Duas técnicas de detecção de anticorpos foram utilizadas neste estudo (ID e WB) as quais revelaram uma positividade de 2,28% e 12,85%, respectivamente para ID e WB. Cabe salientar que os pacientes que apresentaram reatividade na técnica de ID, também apresentaram no método de WB. Tal diferença é justificada pelo limiar de detecção de cada técnica, uma vez que a ID é capaz de detectar de 20-200 µg de anticorpo/mL enquanto os ensaios imunoenzimáticos podem detectar concentrações inferiores a 0,0001 µg de anticorpo/mL (ROSE; HAMILTON; DETRICK; 2002).

Das 45 amostras de soro reagentes para anticorpos anti-*Histoplasma*, 23 apresentaram somente a banda M (51,11%), a qual é visualizada em soros dos pacientes antes da banda H e persiste por mais tempo. Anticorpos anti-M estão presentes no soro de pacientes com infecção aguda ou crônica (ROSSINI; GOULART 2006; KAUFFMAN, 2007). A banda M é mais frequentemente identificada e permanece por anos no soro do paciente após uma infecção ativa (AZAR et al., 2015).

A banda H raramente é encontrada (<20%), altamente sugestiva de infecção ativa e persiste por menos tempo do que a banda M (HAGE et al., 2015). Ambas as bandas, H e M, foram detectadas no soro de 19 pacientes (42,22%). A presença de anticorpos anti-M e anti-H é sugestivo de diagnóstico positivo para

histoplasmose, ainda que a associação de dados clínicos e epidemiológicos seja necessária para a conclusão do diagnóstico (ALMEIDA et al., 2019).

De acordo com Messina (2022), a PCM é uma micose sistêmica de importância significativa na saúde pública e afeta mais comumente a população rural. A infecção ocorre nos pulmões após a inalação conídios de *Paracoccidioides* spp. presentes no solo de áreas endêmicas e podem evoluir para a doença. A PCM ocorre principalmente em trabalhadores rurais que reativam focos fúngicos endógenos nos pulmões, tempos após a exposição e inalação dos conídios. Esta provavelmente seja uma razão pela qual poucos casos de coinfeções PCM/COVID-19 foram descritas até o presente. Esta informação reforça o resultado encontrado em nosso estudo, que ao avaliar a detecção de anticorpos anti-*Paracoccidioides*, soros de nenhum paciente testado foram reagentes.

As alterações pulmonares pré-existentes provocadas por *Paracoccidioides* spp. são consideradas um fator de risco aumentado para casos graves de COVID-19, ainda assim, poucos casos têm sido descritos na literatura . Algumas sobreposições de imagens radiológicas que podem ser encontrados tanto em PCM quanto na COVID-19 podem atrasar o diagnóstico de coinfeção por pneumonia viral, mas também pode mascarar a doença de base uma vez que o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 foi priorizada. Sugere-se que vários casos diagnosticados como COVID-19 eram na verdade um caso de infecção por PCM, devido às lesões pulmonares encontradas e também por causa das manifestações orais observadas nos pacientes (BALDO et al., 2022).

Uma limitação deste estudo se deve ao fato de não termos avaliado a detecção de anticorpos anti-*Paracoccidioides* por uma metodologia mais sensível que a ID, como um ensaio imunoenzimático, com maiores níveis de sensibilidade.

Um estudo de caso brasileiro realizado no Rio de Janeiro, mais precisamente no Centro Hospitalar do INI FIOCRUZ, reportou um caso de infecção hospitalar por SARS- Cov-2 em paciente diagnosticado com PCM juvenil aguda. Foi realizado nesse estudo exame histopatológico, com presença de múltiplas estruturas fúngicas em brotamento, típicas de paracoccidioides na coloração de prata, microscopia com presença de formas fúngicas e cultura positiva para Pb.

Nesse estudo em questão, também foi realizada atécnica de ID, que apresentou resultados positivo para anticorpos anti- *Paracoccidioides* com titulação de 1:512 (De MACEDO et al., 2020).

Uma infecção fúngica importante no contexto da COVID-19 é a aspergilose invasiva, uma doença fúngica grave que ocorre em pacientes imunocomprometidos (KOSMIDIS, DENNING., 2015). Nesses pacientes, com função imunológica prejudicada, o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* no pulmão leva à destruição tecidual, invasão angio tecidual, sepse em sua fase final e, às vezes, hemoptise (MCCARTHY et al., 2017). Nas últimas décadas as infecções por *Aspergillus* spp. ganharam notabilidade pelo aumento da incidência associada ao crescimento da população de risco, entre eles, receptores de órgãos sólidos e medula óssea, portadores de neoplasias, diabetes mellitus, idosos, prematuros, pneumopatas crônicos e portadores de HIV (NUCCI et al., 2013).

Apesar da sintomatologia da aspergilose, o perfil também é de risco para a COVID-19. O que corrobora o único caso de reatividade positiva para anticorpos anti- *Aspergillus* encontrado em nosso estudo, onde uma paciente idosa, com 79 anos de idade, e com histórico prévio de diabetes mellitus apresentou reatividade para a detecção de anticorpos anti-*Aspergillus* pelo teste ELISA.

No contexto da COVID-19 a aspergilose foi reconhecida como infecção secundária, principalmente entre pacientes críticos em unidades de terapia intensiva (UTI) por causar insuficiência respiratória quando associada à influenza e a outros coronavírus, como SARS-CoV 1 e MERS-CoV, levando à deterioração clínica e mortalidade (FREDERIC et al., 2021).

Em um estudo de caso, Schein e colaboradores (2020) uma mulher de 87 anos deu entrada no hospital em estado grave, com tosse, febre, dispneia grave e diarreia, que vinha piorando progressivamente por 10 dias. O exame médico inicial mostrou uma frequência respiratória de 30/min, e uma oximetria de pulso (SpO<sub>2</sub>) de 67%, subindo para 92% sob oxigênio suplementar a 15 L/min. A paciente evoluiu para óbito. O quadro clínico apresentado neste relato se assemelha ao encontrado em nosso estudo, no qual a paciente apresentou como sintomas clínicos saturação abaixo de 95%, diarreia e náuseas.

A candidíase está entre as infecções fúngicas mais comuns de ocorrência hospitalar, principalmente nos pacientes em estado crítico. Leveduras do gênero

*Candida* fazem parte da microbiota do organismo humano, devido a isso, só pode causar uma infecção quando ocorre distúrbios no sistema imune do hospedeiro (SALEHI et al., 2019).

A colonização do trato respiratório, desencadeada por *Candida* sp, é comum em pacientes que são submetidos a ventilação mecânica por um período superior a dois dias. Isso ocorre devido à disseminação hematogênica pulmonar ou pela aspiração de conteúdos colonizados de origem orofaríngea ou gástrica (MURRAY et al., 1977).

Em nosso estudo, foi observado que dos pacientes reagentes a anticorpos anti- *Candida* no ELISA apresentaram um aumento de 25% em média na produção de anticorpos, quando comparados à evolução da concentração de anticorpos ao longo dos dias de hospitalização do paciente. Tal fato é suportado por Salehi (2019), onde os pacientes hospitalizados por longos tempos tendem a estar propensos à infecção hospitalar por *Candida*.

Algumas infecções com predisposição para gênero são comuns, resultando em infecções mais graves em um sexo do que no outro (GHAZEERI et al., 2011 ; GARCÍA- GÓMEZ et al., 2013 ). Os hormônios sexuais estrogênio, testosterona e progesterona regulam muitas funções do sistema imunológico e, geralmente, os homens são mais propensos a infecções do que as mulheres, pois as respostas imunes gerais são mais baixas na população masculina (TANEJA, 2018). Além do impacto dos hormônios sexuais na função das células imunes, os hormônios sexuais também têm um efeito direto na patogenicidade microbiana, aumentando a persistência microbiana, o metabolismo e a expressão gênica de virulência (CHOTIRMALL et al., 2012 ). Um dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento de candidíase nas mulheres são os níveis elevados de estrogênio que decorrem do uso de anticoncepcionais, gravidez entre outros (DENNERSTEIN e ELLIS, 2001), pois o estrogênio aumenta a produção de glicogênio na mucosa vaginal, o que proporciona um ambiente rico em nutrientes para o crescimento de *C. albicans*. Portanto, o estrogênio desempenha um papel fundamental na predisposição das mulheres à candidíase (DENNERSTEIN e ELLIS, 2001).

O predomínio de episódios de candidíase em mulheres reportado na literatura está de acordo com o resultado encontrado em nosso trabalho, onde o sexo feminino apresentou maior número de pacientes reagentes para a detecção de anticorpos anti- *Candida*. Tal fato apresentou significância estatística com P-valor= 0,0057.

Alguns trabalhos relatam que a alta taxa de mortalidade está ocorrendo entre pacientes com candidíase associada à COVID-19. A taxa de mortalidade nesses casos chega a 83% mesmo com o uso de terapia antifúngica. Tal relato enaltece a gravidade da COVID-19 e ressalta a importância do diagnóstico rápido e do início oportuno do tratamento antifúngico (KAYAASLAN et al, 2022; ARASTEHFAR et al, 2020; ERAMI et al, 2022). Embora em nosso estudo, a candidíase não tenha sido confirmada, verificamos que o desfecho clínico quando comparados os grupos estudados, pacientes com soros reagentes e não reagentes para anticorpo anti-*Candida*, apresentou variação. Dos 111 pacientes que foram a óbito, 47 (42,3%) eram soros reagentes para anticorpos anti-*Candida*, com significância estatística (P-valor=0,0142), indicando uma alta taxa de mortalidade em pacientes que vieram a óbito e apresentavam anticorpos anti-*Candida*.

Diabetes mellitus é uma das comorbidade frequentemente associadas em pacientes com Covid-19 (GUAN et al, 2020; YANG et al, 2020; RAMADAN et al, 2020).

Neste estudo também foi verificado uma taxa significativa de pacientes COVID- 19 positivo e diabetes, onde 43,4% dos pacientes soro reagentes para anticorpos anti- *Candida* apresentavam diabetes, contra 30,2% dos pacientes não diabéticos (P-valor = 0,0168).

Na prática clínica o padrão clínico mais observado na candidemia em adultos consiste na presença de febre acompanhada de calafrios, mialgia, taquicardia e hipotensão (DIGNANI et al., 2003; ). Embora não tivemos como confirmar se nossos pacientes estavam com candidíase no momento da coleta de soro, verificamos que a maioria de nossos pacientes apresentaram tosse e mialgia como sintomas com significância estatística com p-valor igual a 0,0089 e 0,0004 respectivamente.

## 7. CONCLUSÕES

Ao realizarmos os testes de detecção de anticorpos anti-*Aspergillus* spp., *Candida* spp., *H. capsulatum* e *P. brasiliensis* em pacientes com COVID-19, observamos uma frequência importante no que se refere a detecção de anticorpos anti- *Candida* spp. e *H. Capsulatum*.

Quando foi possível comparar dois métodos disponíveis para detecção de anticorpos no diagnóstico de infecções fúngicas em pacientes com COVID-19, reafirmamos a maior capacidade de detecção dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA e WB) frente ao teste de precipitação em gel de agarose (ID).

Este estudo nos mostrou uma frequência importante das infecções causadas por fungos em pacientes com COVID-19. Principalmente quando avaliada a detecção de anticorpos anti-*Candida* spp. e anti-*H. capsulatum*.

E sobre o impacto clínico causado pelas infecções fúngicas em pacientes com COVID-19, destacamos a expressiva mortalidade entre os pacientes com COVID-19 que apresentaram anticorpos anti-*Candida* spp.

Ao se tratar do diagnóstico de CAPA ser realizado através do teste de detecção de anticorpos, segundo esse estudo não é possível a inclusão da sorologia na definição de CAPA.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdoli S., Katherine MB, Fanti P., Silveira MSVM, Hessler D. Development and validation of a scale to measure diabetes burnout. *J. Clin. Trad. Endocrinol.* 2021; 23.

Alangaden, G. J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infectious Disease Clinics of North America.* 2011; 25.

Alanio, A.; Dellièrre, S.; Fodil, Sl. High prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill 2 COVID-19 patients. *MedRxiv preprint.* 2020.

Alexopoulos, C. J.; Storck, R.; Constantine J. *Bacteriological reviews*, June 1970, p.126- 154.

Almeida, SR. 2008. *Micologia.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Almeida, M. A.; Almeida-silva, F.; Guimarães, A. J.; Almeida-paes, R.; Zancopé-Oliveira, R. M. The occurrence of histoplasmosis in Brazil: A systematic review, *International Journal of Infectious Diseases*, Volume 86, 2019, Pages 147-156.

Almeida, M. A.; Pizzini, C. V.; Damasceno, L. S. et al. Validation of *western blot* for *Histoplasma capsulatum* antibody detection assay. *BMC Infect Dis.* 2016; 16.

Almeida-Paes R, Bernardes-Engemann AR, da Silva Motta B, Pizzini CV, de Abreu Almeida M, de Medeiros Muniz M, Dias RAB, Zancopé-Oliveira RM. Immunologic Diagnosis of Endemic Mycoses. *J Fungi (Basel).* 2022 Sep 22; 8(10): 993.

Amirshahi A., Wan c., Beagley K., Latter J., Symonds I., Timms p. Modulation of the *Chlamydia trachomatis* in vitro transcriptoma resposta pelos hormônios sexuais estradiol e progesterona. *BMC Microbiol.* 2011; 11.

Amorim dos santos, J; Normando, AGC; Carvalho da silva, RL. Oral mucosal lesions in a COVID-19 patient: New signs or secondary manifestations? *International Journal of Infectious Diseases*, v. 97, p. 326–328, 2020.

Apostolopoulou A, Esquer GZ, Vijayvargiya P, Lerner AH, Farmakiotis D. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review of the Literature. *Diagnostic.* 2020; 10.

Arastehfar A, Carvalho A, Nguyen MH, Hedayati MT, Netea MG, Perlin DS. COVID-19- Associated Candidiasis (CAC): An Underestimated Complication in the Absence of Immunological Predispositions? *J Fungi.* 2020; 6: 211.

Araujo, R., Pina-vaz, C. E Rodrigues, A. G. Surveillance of airborne Aspergillus in a Portuguese University Hospital, *Mycoses*, 48(2), pp. 45.

Araúz AB, Papineni P. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2021 Jun; 35(2):471-491.

Azar, M., Bahr, N., Loyd, J., Hage, C., Wheat, L. (2015). *Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management.* Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2015; 36.

Baldo-ME, Raffaele RM, Da silva santos PS, Ramalho RT. Diagnostic challenge in an individual with Paracoccidioidomycosis during hospitalization in times of COVID-19. *Int J Innov Educ Res.* 2022; 10(2):149-58.

Barnes RA, Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *J. Antimicrob Chemother.* 2008; 61.

Berman J, Sudbery PE. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from developing yeast. *Nat Rev Genet.* 2002; 3:918-30.

Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel).* 2017; 3(4):57.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

Brown GD, Denning DW, Gownar, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden K: Human fungal infections. *Sci Transl Med.* 2012; 4 (165).

Buitrago MJ, Berenguer J, Mellado E, Rodriguez-tudela JL, Cuenca-estrella M. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a realtime PCR-based assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006; 665-8.

Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2021; 415-434.

Cafardi J, Haas D, Lamarre T, Feinberg J, Opportunistic Fungal Infection Associated With COVID-19, *Open Forum Infectious Diseases.* 2021; 8.

Canela HMS, Cardoso B, Vitali LH, Coelho HC, Martinez R, Ferreira MEDS. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses.* 2018; 61(1): 11-21.

Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(1): 130-80.

Chaves, A.F.A.; Navarro, M.V.; De Barros, Y.N.; Silva, R.S.; Xander, P.; Batista, W.L. Updates in Paracoccidioides Biology and Genetic Advances in Fungal Manipulation. *J.Fungi.* 2021, 7,116.

Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, Cornet M, Vu Thien H, Gluckman E, Brücker G, Latgé JP. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(6): 1494-500.

Chew NWS, Lee GKH, Tan BYQ, Jing M, Goh Y, Ngiam NJH, Yeo LLL, Ahmad A, Ahmed Khan F, Napolean Shanmugam G, Sharma AK, Komalkumar RN, MeenakshiPV, Shah K, Patel B, Chan BPL, Sunny S, Chandra B, Ong JJY, Paliwal PR, Wong LYH, Sagayanathan R, Chen JT, Ying Ng AY, Teoh HL, Tsivgoulis G, Ho CS, Ho RC, Sharma VK. A multinational, multicentre study on the psychological outcomes and associated physical symptoms amongst healthcare workers during COVID-19 outbreak. *Brain Behav Immun.* 2020 Aug; 88:559-565.

Chong, W. H.; Saha, B. K.; Ramani, A. Chopra, A. State-of-the-art review of secondary pulmonary infections in patients with COVID-19 pneumonia, *Infection*, 2020.

Chotirmall SH, Smith SG, Gunaratnam C, Cosgrove S, Dimitrov BD, O'Neill SJ, Harvey BJ, Greene CM, McElvaney NG. Effect of estrogen on *Pseudomonas mucoidy* and exacerbations in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 2012 May 24; 366(21): 1978-86.

Cicek N, Yildiz N, Kadayifci EK, Gokce I, Alpay H. Invasive aspergillosis in a patient with end stage renal disease. *Med Mycol Case Rep.* 2017 Jul 11; 18:12-14.

Coleman RM, Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis *Appl Microbiol.* 1972.

Colombo AL, Cortes JA, Zurita J, Guzman-Blanco M, Alvarado Matute T, de Queiroz Telles F, Santolaya ME, Tiraboschi IN, Echevarría J, Sifuentes J, Thompson-Moya L, Nucci M; Latin America Invasive Mycosis Network. Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America. Latin America Invasive Mycosis Network. *Rev Iberoam Micol.* 2013 Jul-Sep; 30(3): 150-7.

Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-skaggs B, Da matta DA, Warnock D, Morgan J; Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol.* 2006.

Colombo AL, Tobon A, Restrepo A, Queiroz-telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol.* 2011; 49.

Corrêa, P. R. L. A importância da vigilância de casos e óbitos e a epidemia da COVID- 19 em Belo Horizonte. *Revista Brasileira de Epidemiologia.* 2020; 23.

Correia SS. Cirurgia no aspergiloma pulmonar: experiência mono-institucional, *Acta Med Port.* 2014; 4: 417-421.

Cortés JA, Ruiz JF, Melgarejo-Moreno LN, Lemos EV. Candidemia in Colombia. *Biomedica.* 2020 Mar 1;40(1):195-207.

Couppie, P.; Aznar, C.; Carme, B. et al. American histoplasmosis in developing countries with a special focus on patients with HIV: diagnosis, treatment, and prognosis. *Curr Opin Infect Dis*, v. 19, n. 5, p. 443-9, 2006.

Coura JR, Pereira NG. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 1ª. Ed. Editora Elsevier, 2019.

Damasceno LS, Ramos AN Jr, Alencar CH, Gonçalves MV, de Mesquita JR, Soares AT, Coutinho AG, Dantas CC, Leitão Tdo M. Disseminated histoplasmosis in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a North-eastern area of Brazil. *Mycoses*. 2014 Jul; 57(7): 406-13.

De jong AW, Dieleman C, Carbia M, Mohd Tap R, Hagen F. Performance of Two Novel Chromogenic Media for the Identification of Multidrug-Resistant *Candida auris* Compared with Other Commercially Available Formulations. *J Clin Microbiol*. 2021.

De Macedo PM, Almeida-paes R, Freitas DF, Varon AG, Paixão AG, Romão AR, Coutinho ZF, Pizzini CV, Zancopé-oliveira RM, Francesconi Do Valle AC. Acute juvenile Paracoccidioidomycosis: A 9-year cohort study in the endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017.

De Macedo PM, Freitas AD, Bártholo TP, Bernardes-engemann AR, Almeida MA, Almeida-silva F, Zancopé-oliveira RM, Almeida-paes R. Acute Pulmonary Histoplasmosis Following COVID-19: Novel Laboratorial Methods Aiding Diagnosis. *J Fungi (Basel)*. 2021; 7(5): 346.

De Macedo PM, Freitas DFS, Varon AG, Lamas CDC, Ferreira LCF, Freitas AD, Ferreira MT, Nunes EP, Siqueira MM, Veloso VG, do Valle ACF. COVID-19 and acute juvenile paracoccidioidomycosis coinfection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Aug 10; 14(8).

De Medeiros MAP, De melo APV, De bento AO, De Souza LBFC, DE Neto FAB, Garcia JB-L, Zuza-Alves DL, Francisco EC, DE Melo Asa Chaves GM Epidemiologia e fatores prognósticos da candidemia nosocomial em Nordeste do Brasil: Um estudo retrospectivo de seis anos. *PLOS UM*. 2019; 14.

De Pauw, B.; Walsh, T. J.; Donnelly, J. P. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46, n. 12, p. 1813-1821.

Deepe GS JR, Buesing WR. Deciphering the pathways of death of *Histoplasma capsulatum*-infected macrophages: implications for the immunopathogenesis of early infection. *J Immunol*. 2012; 188.

Deepe GS, Jr., Durose GG. Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1995.

Dennerstein GJ, Ellis DH. Oestrogen, glycogen and vaginal candidiasis. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2001 Aug; 41(3): 326-8.

Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis. 1998; 26 (4): 781–803.

Diezmann S, Cox CJ, Schönian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5624-35.

Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie E. *Candida*. IN: Anaissie E, Mcginnis MR, Pfaller MA Medical Mycology. 1ª Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003.

Dingle TC, Croxen MA, Fathima S, Shokoples S, Sonpar A, Saxinger L, Schwartz IS. Histoplasmosis acquired in Alberta, Canada: an epidemiological and genomic study. Lancet Microbe. 2021.

Du, Z., wang, L., Cauchemez, S Risk of transporting 2019 novel coronavirus disease from Wuhan to other cities in China Emerg. Infectar. Dis. 2020.

Erami M, Raiesi O, Momen-heravi M, Getso MI, Fakhrehi M, Mehri N, Yarahmadi M, Amiri S, Raissi V, Hashemi SJ. Clinical impact of *Candida* respiratory tract colonization and acute lung infections in critically ill patients with COVID-19 pneumonia. Microb Pathog. 2022.

Escobedo RA, Kaushal D, Singh DK. Insights Into the Changing Landscape of Coronavirus Disease 2019. Front Cell Infect Microbiol. 2022.

Falci DR, Monteiro AA, Braz Caurio CF, Magalhães TCO, Xavier MO, Basso RP, Melo M, Schwarzbald AV, Ferreira PRA, Vidal JE, Marochi JP, Godoy CSM, Soares RBA, Paste A, Bay MB, Pereira-Chiccola VL, Damasceno LS, Leitão TDMJS, Pasqualotto AC. Histoplasmosis, An Underdiagnosed Disease Affecting People Living With HIV/AIDS in Brazil: Results of a Multicenter Prospective Cohort Study Using Both Classical Mycology Tests and *Histoplasma* Urine Antigen Detection. Open Forum Infect Dis. 2019; 6(4).

Fava-netto C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. Rev InstAdolfo Lutz.1961; 21:99-194.

Ferreira, M. S.; Borges, A. S.; Histoplasmosis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009; 42.

Figueiredo A. M, Figueiredo D. C. M. M, Gomes L. B, Massuda A, Gil-garcía E, Vianna

R. P. T. Social determinants of health and COVID-19 infection in Brazil: an analysis of the pandemic. Rev Bras Enferm. 2020; 73.

Fioravanti, C. O ataque silencioso. Pesquisa FAPESP. 2016; 243, p. 42– 45, 2016.

Fortes, Maria Rita parise et al. Imunologia da paracoccidioidomicose. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2011; v. 86, n. 3.

Frederic L, Lewis RE, Walsh TJ, KOnTOyiannis DP. Navigating the uncertainties of COVID-19 associated aspergillosis (CAPA): A comparison with influenza associated aspergillosis (IAPA). *The Journal of Infectious Diseases*. 2021; 1-40.

Gangneux, J. P.; Bougnoux, M. E.; Dannaoui, E. Invasive fungal diseases during COVID-19: We should be prepared. *J Mycol Med*. 2020.

García-Gómez E, González-Pedrajo B, Camacho-Arroyo I. Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:928290.

Gervásio, FM.; Franco, JVV; Sampaio, A. de S.; Passos, AR dos.; Sakamoto, AM.; Silva, D. de S. .; Braz, DC.; Seixas, . GC.; Spindola, LA.; Abreu, TM de Revisão sistemática da COVID-19 associada à aspergilose: perspectivas para um novo diagnóstico. *Investigação, Sociedade e Desenvolvimento*, v 11, n. 12, 2022.

Ghazeeri G, Abdullah L, Abbas O. Immunological differences in women compared with men: overview and contributing factors. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Sep; 66(3): 163-9.

Goodley JM, Clayton YM, Hay RJ. Environmental sampling for aspergilli during building construction on a hospital site. *J Hosp Infect*. 1994 Jan; 26(1): 27-35.

Goodwin, R. A.; Desprez, R. M. Pathogenesis and clinical spectrum of histoplasmosis. *South Med*. 1973, 66.

Gorbalenya, A.G; Baker, S.C; Baric, R.S. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*. 2020; V5 p. 536-544.

Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, DuB, Li LJ, Zeng G, Yuen KY, Chen RC, Tang CL, Wang T, Chen PY, Xiang J, Li SY, Wang JL, Liang ZJ, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY, Zhong NS; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020 Apr 30; 382(18): 1708-1720.

Guimaraes AJ, Pizzini CV, De Matos Guedes HL, ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. *J Med Microbiol* 2004; 53.

Guo Y, Cao Q, Hong Z. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Med Res*. 2020,7:11.

Habas, Khaled; Nganwuchu, Chioma; Shahzad, Fanila; et al. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2020, v. 18, n. 12, p. 1201–1211.

Hage CA, Azar MM, Bahr N, Loyd J, Wheat LJ. Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence- Based Approach to Diagnosis and Management. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015; 36(5):729-45.

Hamilton AJ, Bartholomew MA, Figueroa J, Fenelon LE, Hay RJ. Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* Var. *capsulatum* is a catalase which exhibits crossreactivity with other dimorphic fungi. *J Med Vet Mycol*. 1990; 28(6):479-85.

Hatlen TJ, Filler SG, Bayer A, Shah S, Shodhan S, van tt. *Aspergillus* endocarditis diagnosed by fungemia plus serum antigen testing. *Med Mycol Case Rep*. 2018; 23:1-3.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007 May; 111(Pt 5):509-47.

Hoenigl M, Seidel D, Sprute R, Cunha C, Oliverio M, Goldman GH, Ibrahim AS, Carvalho A. COVID-19-associated fungal infections. *Nat Microbiol*. 2022.

Hospenthal DR, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med Mycol*. 1998Jun; 36(3): 165-8.

Huang, C.; Wang, Y.; Li X. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020.

Kauffman CA. Candiduria. *Clin Infect Dis*. 2005; 41.

Kauffman, C. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20, n. 1, p.115-132.

Kayaaslan B. Characteristics of candidemia in patients with COVID-19; increased incidence, earlier occurrence, and higher mortality rates compared to non-COVID-19 patients. *Mycoses*. 2022; 64.

KLICH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience*, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 1-80, 2007.

Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, Chen SCA, Colombo AL, Hoenigl M, Klimko N, Lass-Flörl C, Oladele RO, Vinh DC, Zhu LP, Böll B, Brüggemann R, Gangneux JP, Perfect JR, Patterson TF, Persigehl T, Meis JF, Ostrosky-Zeichner L, White PL, Verweij PE, Cornely OA; European Confederation of Medical Mycology; International Society for Human Animal Mycology; Asia Fungal Working Group; INFOCUS LATAM/ISHAM Working Group; ISHAM Pan Africa Mycology Working Group; European Society for Clinical Microbiology; Infectious Diseases Fungal Infection Study Group; ESCMID Study Group for Infections in Critically Ill Patients; Interregional Association of Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy; Medical Mycology Society of Nigeria; Medical Mycology Society of China Medicine Education Association; Infectious Diseases Working Party of the German Society for Haematology and Medical Oncology; Association of Medical Microbiology;

Infectious Disease Canada. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis.* 2021 Jun; 21(6):e149-e162.

Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 161-72.

Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax.* 2015 Mar; 70(3): 270-7.

Kozel TR, Wickes B. Diagnóstico de fungos. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014.

Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Heins-vaccari, E.M; Takahashi De Melo, N. *Tratado de Micologia médica; Prefácio: Bertrand Dupont.* 9. Ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970.

Lai CC, Liu YH, Wang YC. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): facts and myths. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020.

Lana, Raquel Martins. Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva. *Cadernos de Saúde Pública.* 2020, v. 36, n. 3, 2020.

Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim WS. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2020 Aug; 81(2): 266-275.

Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev.* 2019 Nov 13; 33(1).

Li LQ, Huang T, Wang YQ, Wang ZP, Liang Y, Huang TB, Zhang HY, Sun W, Wang Y. COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. *J Med Virol.* 2020 Jun; 92(6): 577-583.

Liu S, Li Z, Zheng J, He N. Invasive *Aspergillus* outbreak in inhalation injury: a case presentation and literature review. *BMC Infect Dis.* 2022, 22(1): 386.

Lockhart SR, Toda M, Benedict K, Caceres DH, Litvintseva AP. Endemic and Other Dimorphic Mycoses in The Americas. *J Fungi (Basel).* 2021. Feb 20;7(2):151.

Lorenz C, Ferreira PM, Masuda ET, Lucas PCC, Palasio RGS, Nielsen L, Monteiro PCM, Trevisan CM, Yu Alf, Carvalhanas TRMP. COVID-19 in the state of São Paulo: the evolution of a pandemic. *Rev Bras Epidemiol.* 2021.

Lu X, Zhang L, Du H. SARS-CoV-2 infection in children. *N Engl J Med.* 2020.

Macintyre, C. R.; Chughtai, A. A.; Barnes, M. The role of pneumonia and secondary bacterial infection in fatal and serious outcomes of pandemic influenza a (H1N1). *BMC Infect Dis.* 2018, n. 1, p. 637, 2018.

Martin MA, VanInsberghe D, Koelle K. Insights from SARS-CoV-2 sequences. *Science.* 2021 Jan 29; 371(6528): 466-467.

Martins, Antonio Camargo; Psaltikidis, Eliane Molina; De Lima, Tiago Cristiano. COVID- 19 and invasive fungal coinfections: A case series at a Brazilian referral hospital. *Journal of Medical Mycology.* 2021, V31.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013.

McCarthy MW, Walsh TJ. Special considerations for the diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis. *Expert Rev Respir Med.* 2017 Sep; 11(9): 739-748.

Messina, FA, Giusiano, G, Santiso, G. Endemic mycoses and COVID-19: a review *Curr Fungal Infect Rep.* 2022, 16, 98-106.

Millington MA, Nishioka SA, Martins ST, Santos ZMGD, Lima Júnior FEF, Alves RV. Paracoccidioidomycose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle [Paracoccidioidomycosis: historical approach and perspectives for implementation of surveillance and control]. *Epidemiol Serv Saude.* 2018 Aug 16; 27.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. *Microbiologia Médica.* 6° ed. Ed. Elsevier, 2009.

Nakamura, H. M.; Caldeira, S. M. M. A. G. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. *Rev SOBECC.* 2013, v. 18, n. 3.

Nargesi S, Bongomin F, Hedayati MT. The impact of COVID-19 pandemic on AIDS- related mycoses and fungal neglected tropical diseases: Why should we worry? *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2021, 15.

O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Sep; 71(9): 5544-50.

Oliveira, W. K.; Duarte, E.; França G. V. A.; Garcia, L. P. Como o Brasil pode deter a COVID-Epidemiol. Serv. Saude. 2020, 29.

Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy.* 1958;5:1-78.

Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers.*

- Patti, R.K Dalsania, N. R.; Somal, N.; Sinha,A.; Metha,S.; Ghitan,M.; Seneviratne, C .; Kupfer,Y. et al. Subacute Aspergillosis "Fungal Balls" Complicating COVID-19. J Investig Med High Impact Case Rep.2020.
- Peçanha PM, Peçanha-Pietrobom PM, Grão-Velloso TR, Rosa Júnior M, Falqueto A, Gonçalves SS. Paracoccidioidomycosis: What We Know and What Is New in Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. J Fungi (Basel). 2022.
- Peeling RW, Heymann DL, Teo YY, Garcia PJ. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. Lancet. 2022.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ. Clinical Practice Guideline for the Management of Cryptococcal Disease.Update by Infectious Disease Society of America. Clin Infect Dis 2010; 50(3):291-322.
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ellis, D., Tullio, V., Rodloff, A., Fu, W., Ling, T. A., & the Global Antifungal Surveillance Group. (2010). Results from the Artemis Disk Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. Journal of Clinical Microbiology, 48, 1366-1377.
- Pine L, Gross H, Malcolm GB, George JR, Gray SB, Moss CW. Procedures for the production and separation of H and M antigens in histoplasmin: chemical and serological properties of the isolated products. Mycopathologia. 1977; 61(3): 131-41.
- Pizzini, C. V.; Zancopé-Oliveira, R. M.; Reiss, E. Evaluation of a *western blot* test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol.1999.
- Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. Infect Immun. 1986.
- Queiroz-Telles F, DE Hoog S, Santos DW, Salgado CG, Vicente VA, Bonifaz A, Roilides E, Xi L, Azevedo CM, Da Silva MB, Pana ZD, Colombo AL, Walsh TJ. Chromoblastomycosis. Clin Microbiol Rev. 2017.
- Queiroz-Telles, F.; Fahal, A. H.; Falci, D. R. Neglected endemic mycoses.Lancet InfectDis. 2017.
- Ramadan HK, Mahmoud MA, Aburahma MZ, Elkhawaga AA, El-mokhtar MA, Sayed IM, Hosni A, Hassany SM, Medhat MA. Predictors of Severity and Co-Infection Resistance Profile in COVID-19 Patients: First Report from Upper Egypt. Infect Drug Resist. 2020.

Raper, K.B.; Fennell, D.I. *The genus Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1965, 686p.

Rawson, T. M.; Moore, L. S. P.; Zhu, N. Bacterial and fungal co-infection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clin Infect Dis*, 2020.

Restrepo, M. N., Castro, C., N. Diagnostic methods in mycology. 2017. 32(1), 41–52.

Richardson M, Página I. Serological diagnostic tests for COVID-19: literaturereview. *Curr Fungal Infect Rep*. 2018; 12(3): 127-136.

Richardson, M. D. E Warnock, D. W. *Fungal Infection Diagnosis and Management*, 3th edition.2003.

Richardson M, Page I. Role of Serological Tests in the Diagnosis of Mold Infections.*Curr Fungal Infect Rep*. 2018; 12(3): 127-136.

Riche CVW, Cassol R, Pasqualotto AC. Is the Frequency of Candidemia Increasing in COVID-19 Patients Receiving Corticosteroids? *J Fungi (Basel)*. 2020 Nov 13; 6(4): 286.

Riera FO, Caeiro JP, Angiolini SC, Vigezzi C, Rodriguez E, Icely PA, Sotomayor CE. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics (Basel)*. 2022.

Riggioni C, Comberati P, Giovannini M. A compendium answering 150 questions on COVID-19 and SARS-CoV-2. *Allergy*. 2020; 75(10):2503-2541.

Rijnders, B. J. A.; Schauwvlieghe, A. F. A. D.; Wauters, J. Influenza-associated pulmonary aspergillosis: a local or global lethal combination? *Clin Infect Dis*.2020.

Robinson M.R., Fine H.F., Ross M.L., Mont E.K., Bryant-Greenwood P.K., Hertle R.W., Tisdale J.F., Young N.S., Zeichner S.L., Van Waes C., Whitcup S.M., Walsh T.J. Sino- orbital-cerebral aspergillosis in immunocompromised pediatric patients. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2000; 19: 1197-1203.

Rodrigues CF, Rodrigues ME, Silva S, Henriques M. *Candida glabrata* Biofilms: How Far Have We Come? *J Fungi (Basel)*. 2017 Mar 1;3(1):11.

Rodriguez JY, Le Pape P, Lopez O, Esquea K, Labiosa AL, Alvarez-Moreno C. *Candida auris*: A Latent Threat to Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2021 Nov 2;73(9).

Rose NR, Hamilton RG, Detrick B, eds. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 6thEd.

Rossini TF, Goulart LS. Histoplasmosse clássica: revisão. *Rev Bras Anal Clin*. 2006; 38(4):275-9.

Rosso LH, Carvalho SM, Maurer TC, Rossi D, Camillis MLF, Garcia LMC. Perfil e desfechos clínicos de pacientes internados por COVID-19 em um hospital do Sul do Brasil. *Rev baiana enferm.* 2022; 36.

Roudbary M, Kumar S, Kumar A, Černáková L, Nikoomanesh F, Rodrigues CF. Overview on the Prevalence of Fungal Infections, Immune Response, and Microbiome Role in COVID-19 Patients. *J Fungi (Basel).* 2021; 7(9):720.

Ruan, Q.; Yang, K.; Wang, W. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020.

Rubin R. COVID-19. Vaccines vs Variants-Determining How Much Immunity Is Enough. *Jama.* 2021.

Salazar C., Rua Á. *Hechos Microbiol.* 2012; 3(2); 93-96.

Salehi M, Ahmadikia K, Mahmoudi S, Kalantari S, Jamalimoghadamsiahkali S, Izadi A, Kord M, Dehghan Manshadi sa, Seifi A, Ghiasvand F, Khajavirad N, Ebrahimi S, Koozfar A, Boekhout T, Khodavaisy S. Oropharyngeal candidiasis in hospitalised COVID-19 patients from Iran: Species identification and antifungal susceptibility pattern. *Mycoses.* 2020.

Salmanton-García J, Sprute R, Stemler J, Bartoletti M, Dupont D, Valerio M, Garcia- Vidal C, Falces-Romero I, Machado M, de la Villa S, Schroeder M, Hoyo I, Hanses F, Ferreira-Paim K, Giacobbe DR, Meis JF, Gangneux JP, Rodríguez-Guardado A, Antinori S, Sal E, Malaj X, Seidel D, Cornely OA, Koehler P; FungiScope European Confederation of Medical Mycology/The International Society for Human and Animal Mycology Working Group. COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis, March- August 2020. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27(4): 1077-1086.

San-Blas, G. 1993. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol. Rev* 31:99-113

Sánchez Martín C, Madrid Martínez E, González Pellicer R, Armero Ibáñez R, Martínez González E, Llau Pitarch JV. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute respiratory syndrome by COVID-19. *Rev Esp Anestesiol Reanim (Engl Ed).* 2022 Jan; 69(1): 48-53.

Schein F, H. Munoz-Pons, C. Mahinc, R. Grange, P. Cathébras, P. Flori, Fatal aspergillosis complicating severe SARS-CoV-2 infection: A case report, *Journal de Mycologie Médicale*, Volume 30.

Seagle EE, Jackson BR, Lockhart SR, Georgacopoulos O, Nunnally NS, Roland J, Barter DM, Johnston HL, Czaja CA, Kayalioglu H, Clogher P, Revis A, Farley MM, Harrison LH, Davis SS, Phipps EC, Tesini BL, Schaffner W, Markus TM, Lyman MM. The Landscape of Candidemia During the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic. *Clin Infect Dis.* 2022 Mar 9;74(5):802-811.

Segrelles-Calvo G, Araújo GRS, Lopis-Pastor E, Carrillo J, Hernández M, Rey L, Rodríguez Melean N, Escribano I, Antón E, Zamarro C, García-Salmones M, Frases S. Prevalence of opportunistic invasive aspergillosis in COVID-19 patients with severe pneumonia. *Mycoses*. 2021.

Shikanai-Yasuda, M. A., et al., *Epidemiol. Serv. Saude, Brasília*, 2017.

Silva R. F. Capítulo 8 - Infecções Fúngicas em Imunocomprometidos. *J Bras Pneumol*.2010; 36(1): 142-147.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *Microbiol Rev*. 2012.

Silva, Maria De Lourdes Corradida. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química*. 2006, v. 29, n. 1.

Sobel JD .Vaginitis. *N. Engl. J. Med*. 1997.

Sule WF, Oluwayelu DO. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. *Pan Afr Med J*. 2020.

Talento AF, Hoenigl M. Fungal Infections Complicating COVID-19: With the Rain Comes the Spores. *J Fungi (Basel)*. 2020; 6(4): 279.

Taneja V. Sex Hormones Determine Immune Response. *Front Immunol*. 2018 Aug 27;9:1931.

Thompson GR 3RD, LE T, Chindamporn A, Kauffman CA, Alastruey-izquierdo A, Ampel NM, Andes DR, Armstrong-James D, Ayanlowo O, Baddley JW, Barker BM, Lopes Bezerra L, Buitrago MJ, Chamani-Tabriz L, Chan JFW, Chayakulkeeree M, Cornely OA, Cunwei C, Gangneux JP, Govender NP, Hagen F, Hedayati MT, Hohl TM, Jouvion G, Kenyon C, Kibbler CC, Klimko N, Kong DCM, Krause R, Lee Lee L, Meintjes G, Miceli MH, Rath PM, Spec A, Queiroz-Telles F, Variava E, Verweij PE, Schwartz IS, Pasqualotto AC. Global guideline for the diagnosis and management of the endemic mycoses: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology. *Lancet Infect Dis*. 2021.

Tyrrell, Daj, Almeida, JD, Berry, DM, Cunningham, CH, Hamre, D, Hofstad, MS, Malluci, L., AND Mcintosh, K. Coronaviruses, *Nature*. 1968, 220: 650.

Van Lunzen J, Altfeld M. Sex differences in infectious diseases-common but neglected. *J Infect Dis*. 2014 Jul 15; 209 Suppl 3:S79-80.

Vázquez-González, D.; Perusquía-Ortiz, A. M.; Hundeiker, M.; Bonifaz, A. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v. 11, n. 5, p. 381–394, 2013.

Venda DR. Por que a *Candida albicans* muda? FEMS Levedura Res. 2009; 9:973-89.

Verweij PE, Rijnders BJA, Brüggemann RJM, Azoulay E, Bassetti M, Blot S, Calandra T, Clancy CJ, Cornely OA, Chiller T, Depuydt P, Giacobbe DR, Janssen NAF, Kullberg BJ, Lagrou K, Lass-Flörl C, Lewis RE, Liu PW, Lortholary O, Maertens J, Martin-Loeches I, Nguyen MH, Patterson TF, Rogers TR, Schouten JA, Spriet I, Vanderbeke L, Wauters J, Van de veerdonk FL. Review of influenza-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients and proposal for a case definition: an expert opinion. Intensive Care Med. 2020 46(8): 1524-1535.

Wang Y. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. Virulence. 2015; 6(4): 307-8.

Wanke B, Monteiro PCF, Lazéra MS, Capone D, Bethlem EP, Rego AP. Micoses pulmonares. In: Bethlem NM. Pneumologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1996.

Wanke, B.; Aidê, M. A. Chapter 6 - Paracoccidioidomycosis. J Bras Pneumol. 2009; 35.

Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. Microbiol Mol Biol Rev. 2005 Dec; 69(4): 635-64.

Willinger B. Emerging Fungi and Diagnosis of Fungal Infections: Current Knowledge and New Developments. J Fungi (Basel). 2021 Apr 19; 7(4): 316.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO coronavirus disease (COVID-19). Reference: situation report – 113. 2020.

Xavier A. R.; Silva. J. S.; Almeida. J. C. L.; Conceição. J. F. F.; Lacerda. G. S.; Kanaan. S.; COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus. Bras PatolMed Lab. 2020; 56: 1-9.

Xu C, Jin J, Song J, Yang Y, Yao M, Zhang Y, Zhao R, Chen Z. Application of refined management in prevention and control of the coronavirus disease 2019 epidemic in non-isolated areas of a general hospital. Int J Nurs Sci. 2020; 143-147.

Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, Ji R, Wang H, Wang Y, Zhou Y. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis. 2020 May; 94:91-95.

Yang, X.; Yu, Y.; Xu, J.; Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. Lancet Respir Med, 8, n. 5, p. 475-481, 2020.

Zhai B, Ola M, Rolling T, Tosini NL, Jshowitz S, Littmann ER, Amoretti LA, Fontana E, Wright RJ, Miranda E, Veelken CA, Morjaria SM, Peled JU, van den Brink MRM, Babady NE, Butler G, Taur Y, Hohl TM. High-resolution mycobiota analysis reveals dynamic intestinal translocation preceding invasive candidiasis. Nat Med. 2020 Jan; 26(1): 59-64.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Hurst SF, Peralta JM, Reiss E. Evaluation of cationexchange chromatography for the isolation of M glycoprotein from histoplasmin. *J Med Vet Mycol.* 1993; 31(1): 29-41.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Peralta JM. Immunochemical analysis of the H and M glycoproteins from *Histoplasma capsulatum*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994b; 1(5):563-8.

Zancopé-Oliveira RM, Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Muniz MM, Albuquerque PC, Almeida-Paes R. *Histoplasma*. In: Liu B, editor. *Molecular detection of human fungal pathogens*. Boca Raton: CRC Press; 2011.

Zancopé-Oliveira RM, Muniz MM, Wanke B. *Histoplasmoses*. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.

Zheng, Z; Chen, R.; Li Y. The clinical characteristics of secondary infection of lower respiratory in severe acute respiratory syndrome. *Chin J Respir Crit Care Med*, v.2, p.270–274, 2003.